

Abteilung Virologie, Fachgebiet virale Impfstoffe
Paul-Ehrlich-Institut
Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel

**Untersuchungen zur Optimierung der genetischen
Konstellation von Influenzaimpfstoff-Saatviren unter
Verwendung einer attenuierten Mutante des Virusisolats
A/FPV/Rostock/1934 (H7N1)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nina Alex

geboren in Elmshorn

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Eberhard Hildt

Tag der mündlichen Prüfung am _____

Die Arbeit wurde in dem Fachgebiet virale Impfstoffe der Abteilung Virologie, am
Paul-Ehrlich-Institut, dem Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel in
Langen angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Influenza-A-Viren	3
2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur.....	3
2.1.2 Virusaufbau und Genomorganisation	3
2.1.3 Infektionszyklus	7
2.1.4 Wirtsspektrum und Übertragungswege	9
2.1.5 Klinische Manifestation beim Menschen	11
2.1.6 Das Reverse-Genetik-System zur Erzeugung rekombinanter Influenzaviren	12
2.1.7 FPVmut, eine attenuierte Variante des hochpathogenen A/Huhn/Rostock/1934 ..	14
2.2 Influenza-Vakzine	16
2.2.1 Immunogenität der Influenzaimpfstoffe	17
2.2.2 Influenzaimpfstoffherstellung und Erzeugung der Impfstoffsaatviren	17
2.2.2.1 Saisonale Impfstoffe.....	18
2.2.2.2 Pandemische Impfstoffe.....	19
2.2.3 Impfstoffformulierungen	21
2.2.4 Neuartige alternative Influenzaimpfstoffansätze.....	23
2.3 Zielsetzung	23
3 Material	26
3.1 Chemikalien	26
3.2 Kits	26
3.3 Verbrauchsmaterialien	27
3.4 Geräte und Software	28
3.5 Enzyme	30
3.6 Antikörper und Antigene	30
3.6.1 Primäre Antiseren	30
3.6.2 Sekundäre Antikörper	30
3.6.3 Antigene	31
3.7 Längenstandards	31
3.8 Oligonukleotid-Primer	31
3.9 Vektoren	31
3.10 Virusisolate	32
3.11 Organismen	32
3.11.1 Zelllinien	32
3.11.2 Bakterienstämme	33

Inhaltsverzeichnis

3.12	Kulturmedien	33
3.12.1	Medien für Zelllinien.....	33
3.12.1.1	Kulturmedien	33
3.12.1.2	Medien für Infektionsversuche	33
3.12.2	Medien und Zusätze für Bakterien.....	34
3.13	Puffer und Lösungen	34
4	Methoden.....	39
4.1	Mikrobiologische Methoden	39
4.1.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	39
4.1.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	39
4.2	Zellbiologische Methoden	39
4.2.1	Kultivierung von MDCK II-, 293T-, Vero- und A549-Zellen	40
4.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien zur Lagerung	41
4.2.3	Testung auf Mykoplasmenkontamination	41
4.3	Molekularbiologische Methoden	41
4.3.1	Amplifikation von Nukleinsäuren	41
4.3.1.1	2-Schritt RT-PCR für die Klonierung viraler Genomsegmente	41
4.3.1.2	Überprüfung der Isolatspezifität der Genotypisierungsprimer.....	43
4.3.1.3	1-Schritt RT-PCR zur Genotypisierung rekombinanter Influenzaviren ...	43
4.3.2	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	44
4.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	45
4.3.4	Präparation von Nukleinsäuren	45
4.3.4.1	DNA-Präparation aus Amplifikationsansätzen	45
4.3.4.2	DNA-Präparation aus Agarosegelen.....	45
4.3.4.3	Präparation von Plasmid-DNA	46
4.3.4.4	Präparation viraler RNA	46
4.3.5	Modifizierung von Nukleinsäuren	46
4.3.5.1	Präparative und analytische Restriktionsverdau	46
4.3.5.2	Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten	47
4.3.6	Sequenzierung.....	48
4.4	Proteinbiochemische Methoden.....	48
4.4.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
4.4.2	Westernblot und Immunodetektion im Odyssey-System.....	49
4.5	Virologische Methoden.....	49
4.5.1	Herstellung rekombinanter Influenza Viren mit dem Reverse-Genetik-System	49
4.5.2	Virusvermehrung	51
4.5.2.1	Anzucht im embryonierten Hühnerei	51
4.5.2.2	Anzucht im Zellsystem zur Vermehrung und zum Replikationsvergleich	51
4.5.3	Hämagglutinationstest (HA-Test)	52
4.5.4	Plaque-Assay zur Titrierung infektiöser Einheiten und zur klonalen Selektion	53
4.5.5	Einfacher radialer Immundiffusionstest (SRID)	54
4.5.6	Neuraminidase Aktivitätsassay.....	55
4.5.7	Viruspartikel Anreicherung über einen Sucrose-Stufen-Gradient	56
4.5.8	Morphologie-Analyse im Elektronenmikroskop	57
5	Ergebnisse	58
5.1	Vergleich der Replikationseigenschaften von FPMut und PR8.....	58
5.1.1	FPMut weist <i>in vitro</i> einen niedrigpathogenen Phänotyp auf.....	58

Inhaltsverzeichnis

5.1.2	Replikation des FPVmut und PR8 in den drei für die Impfstoffproduktion verwendeten Vermehrungssystemen	60
5.1.2.1	Virusausbeuten bei Anzucht in Hühnereiern	60
5.1.2.2	Wachstumsverlauf in Vero- und MDCK-Zellen	61
5.1.3	Schnellere lokale Infektionsausbreitung bei FPVmut im MDCK-Zellsystem	62
5.2	Erzeugung rekombinanter Influenzaviren in beiden viralen Hintergrundstämmen	63
5.2.1	Herstellung der Influenza-Reassortanten	63
5.2.2	Identitätsprüfung aller generierten rekombinanten Influenzaviren	65
5.3	Charakterisierung der Replikationseffizienz der rekombinanten Influenzaviren	67
5.3.1	Früher nachweisbarer Infektionsbeginn in MDCK-Zellen bei FPVmut-Reassortanten	68
5.3.2	Beschleunigte Infektionsausbreitung in MDCK-Zellen bei aviären Isolaten im FPVmut-Hintergrund	70
5.4	Analyse der Antigenausbeuten der rekombinanten Influenzaviren	75
5.4.1	Untersuchungen zur Auswirkung der Hintergrundstämmen auf den HA-Gehalt	76
5.4.1.1	Höhere HA-Titer der H5N1-FPVmut-Reassortanten im Hühnerei	76
5.4.1.2	Messung des absoluten HA-Gehalts in der Allantoisflüssigkeit	81
5.4.1.3	Proteinzusammensetzung der rekombinanten Influenzaviren	89
5.4.1.4	Höhere HA-Ausbeute der H5N1-Reassortanten im FPVmut-Hintergrund im Zellkultursystem	93
5.4.2	Gleiche NA-Ausbeute in den rekombinanten Influenzaviren	95
5.5	Morphologie der rekombinanten Influenzaviren	98
6	Diskussion	103
6.1	Ansätze zur Verbesserung der Antigenausbeute für die Influenzaimpfstoffproduktion	103
6.1.1	Das Potenzial des aviären FPVmut als alternativer Akzeptorstamm	104
6.1.2	Eignung von Triple-Reassortanten als Impfstoffsaatviren	106
6.1.2.1	Rekombinationsmöglichkeiten des M-Gensegmentes	106
6.1.2.2	Einfluss des homologen M-Gensegmentes auf die Antigenausbeute ..	108
6.2	Interaktionen zwischen dem M1-Protein und den Oberflächenproteinen HA, NA und M2	110
6.3	Replikationseigenschaften der generierten Reassortanten im Zellkultur-System ...	116
6.4	Saisonale und pandemische Impfstoffe	117
7	Literaturverzeichnis	121
8	Anhang	132
8.1	Oligonukleotide	132
8.2	Plasmide	134
8.3	Influenzasequenzen	135
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		XI
LEBENS LAUF		XII
DANKSAGUNG		XIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1	Schematischer Aufbau eines Influenza-A-Viruspartikels	4
Abbildung 2-2	Übersicht der verschiedenen RNA-Moleküle der Influenza-A-Viren	6
Abbildung 2-3	Schematische Darstellung eines Infektionszyklus der Influenza-A-Viren.....	9
Abbildung 2-4	Wirtsspektrum und mögliche Übertragungswege der Influenza-A-Viren.....	10
Abbildung 2-5	Das Reverse-Genetik-System zur Herstellung rekombinanter Influenzaviren	14
Abbildung 2-6	Aminosäuresequenzvergleich der HA-Spaltstelle des FPV mit dem FPVmut.....	15
Abbildung 2-7	Übersicht der Prozessschritte bei der Influenzaimpfstoffproduktion	19
Abbildung 2-8	Zeitverlauf neuartiger Influenzasubtypen in der humanen Population	20
Abbildung 2-9	Übersicht unterschiedlicher Influenza Impfstoffformulierungen.....	22
Abbildung 5-1	Trypsinabhängige Replikation des FPVmut in Vero-, A549- und MDCK-Zellen	59
Abbildung 5-2	Virusausbeute des PR8 und FPVmut in Hühnereiern	60
Abbildung 5-3	Replikationsvergleich zwischen FPVmut und PR8 in Vero- und MDCK-Zellen	61
Abbildung 5-4	Plaque-Morphologie FPVmut und PR8 in MDCK-Zellen	62
Abbildung 5-5	Amplifizierte M-, NA- und HA-Gensegmente des H9N2-Isolates	64
Abbildung 5-6	Nachweis der Isolatspezifität der Genotypisierungsprimer exemplarisch für die H9N2- Primer sowie der Akzeptorstamm spezifischen NP-Primer	66
Abbildung 5-7	HA Genotypisierung der H9N2-Doppel-Reassortanten	67
Abbildung 5-8	Infektionsausbreitung der H5N1-Reassortanten in MDCK-Zellen	71
Abbildung 5-9	Infektionsausbreitung der H9N2-Reassortanten in MDCK-Zellen	72
Abbildung 5-10	Infektionsausbreitung der H1N1pdm09-Reassortanten in MDCK-Zellen.....	73
Abbildung 5-11	Infektionsausbreitung der H3N2-Reassortanten in MDCK-Zellen	74
Abbildung 5-12	Infektionsausbreitung der H1N1-Reassortanten in MDCK-Zellen	75
Abbildung 5-13	Bestimmung der PFU-Titer der rekombinanten Viren im Hühnerei	77
Abbildung 5-14	Gemittelte Ausbeuten an HA-Einheiten bei Vermehrung im Hühnerei.....	79
Abbildung 5-15	Exemplarische Darstellung einer SRID-Assay Platte und deren Auswertung.....	82
Abbildung 5-16	Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H5N1-Reassortanten	83
Abbildung 5-17	Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H9N2-Reassortanten	84
Abbildung 5-18	Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H1N1pdm09-Reassortanten	86
Abbildung 5-19	Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H3N2-Reassortanten	87
Abbildung 5-20	Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H1N1-Reassortanten	88
Abbildung 5-21	Elektrophoretische Auftrennung der Allantoisflüssigkeit infizierter Hühnereier	90
Abbildung 5-22	Exemplarische Darstellung eines Immunoblots zur Analyse des HA/NP Verhältnisses der rekombinanten Influenzaviren	91
Abbildung 5-23	Zeitabhängige HA-Ausbeuten der H5N1-Reassortanten im Zellkultursystem	94
Abbildung 5-24	Photometrische Messdaten zum indirekten Nachweis der NA-Aktivität der H1N1pdm09-, H5N1- und H9N2-Reassortanten	96
Abbildung 5-25	Verhältnisse der NA-Aktivität zwischen den FPVmut- und den PR8-Reassortanten der H1N1pdm09-, H5N1- und H9N2-Isolate	97
Abbildung 5-26	Morphologie der Akzeptorstämme	99
Abbildung 5-27	Morphologie der H5N1-Doppel-Reassortanten	100
Abbildung 5-28	Morphologie der H5N1-Triple-Reassortanten.....	101
Abbildung 6-1	Sequenz der transmembranen und cytoplasmatischen Abschnitte der HA-, NA- und M2-Proteine der verwendeten Influenzaisolate	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der Gensegmente sowie der Proteine und deren Funktionen des PR8-Isolates A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	5
Tabelle 2:	Zellzahlen/Wachstumsfläche für Infektionsexperimente.....	40
Tabelle 3:	Isolat-Bezeichnungen der verwendeten Donorviren	63
Tabelle 4:	Übersicht der generierten rekombinanten Influenzaviren	65
Tabelle 5:	Replikationsvergleich der rekombinanten Influenzaviren im MDCK-Zellsystem nach vorheriger Virusvermehrung in MDCK-Zellen.....	68
Tabelle 6:	Replikationsvergleich der rekombinanten Influenzaviren im MDCK-Zellsystem nach vorheriger Virusvermehrung in embryonierten Hühnereiern	69
Tabelle 7:	Maximale Ausbeute an HA-Einheiten bei Vermehrung im Hühnerei	80
Tabelle 8:	Prozentuale HA-Ausbeuten des FPVmut im Vergleich zu PR8 im SRID-Assay	89
Tabelle 9:	Gegenüberstellung der SRID und der Immunoblot Ergebnisse	92
Tabelle 10:	Homologiegrad der M1- und M2-Proteine der verwendeten Influenzaisolat	111
Tabelle 11:	Homologiegrad der HA- und NA-Proteine der verwendeten Influenzaisolat	114

Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien, Substanzen und Lösungen

A	Amp	Ampicillin
		APS	Ammoniumpersulfat
B	BSA	Bovines Serumalbumin
		BGH	Bovines Wachstumshormon
C	CO ₂	Kohlendioxid
D	def	definiert
		DMSO	Dimethylsulfoxid
		DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
		DTT	Dithiotreitol
E	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	FKS	Fötales Kälberserum
H	HCl	Salzsäure
		Hepes	4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazinethansulfonsäure
L	LB	Luria-Bertani Medium
M	MEM	Eagle`s Minimum essential Medium
N	NaCl	Natriumchlorid
P	Pen	Penicillin
		PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Ionischer Phosphatpuffer
		PBS-T	Ionischer Phosphatpuffer mit Tween20
R	RPMI	Roswell Park Memorial Medium
S	SDS	Natriumdodecylsulfat
		SOB	<i>Super optimal broth</i> , Nährmedium
		Strep	Streptomycin
T	TAE	Tris-Acetat-EDTA
		TBA	Thiobarbitursäure
		TE	Tris-EDTA
		TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
		TPCK	L-(tosylamido-2-phenyl ethyl)-chloromethyl Keton
		Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan

Molekularbiologische und biochemische Abkürzungen

A	as	<i>antisense</i> , komplementäre Sequenz zur mRNA
		AS	Aminosäure
C	ca	<i>cold-adapted</i> , kälte-adaptiert
		cDNA	komplementäre DNA
D	DNA	Desoxyribonukleinsäure
		dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
H	HA bzw. H	Hämagglutinin
		HA ₀	HA-Vorläuferprotein
		HA ₁	aminoterminal, globuläre Untereinheit des HA-Proteins
		HA ₂	carboxyterminale Untereinheit des HA-Proteins
		HA-Titer	Hämagglutinationstiter
M	M1	Matrixprotein
		M2	Ionenkanalprotein
		mRNA	<i>Messenger</i> RNA, Boten-RNA
		MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Verhältnis Virus/Zelle
		mut	mutiert = attenuiert

Abkürzungsverzeichnis

		vRNA	virale RNA
N	NA bzw. N	Neuraminidase
		NP	Nukleoprotein
		NS1	Nichtstrukturprotein
		NS2/NEP	Nuklearexport-Protein
O	Ov	<i>overlay</i> , Überzug/Oberschicht
		ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
P	PA	Polymerase azide
		PB1	Polymerase basisch 1
		PB1-F2	zweiter ORF des Influenza-Genesegments 2
		PB1-N40	aminoterminal verkürzte Form des PB1
		PB2	Polymerase basisch 2
		PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
		PCR	Polymerasekettenreaktion
		PFU	<i>Plaque forming units</i> , infektiöse Einheiten
		Pol	Polymerase
		Prod.-Nr.	Produktnummer
R	rDNA	ribosomale DNA
		RNA	Ribonukleinsäure
		vRNA	virale Genom-RNA
		RNP	Ribonukleoproteinkomplexe
		RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
S	s	<i>sense</i> , Sequenz identisch mit mRNA
		SRID	<i>single-radial-Immundiffusion-Assay</i> , Einfacher radialer Immundiffusionstest
W	WB	Westernblot

Technische Abkürzungen und physikalische Einheiten

		%	Prozent
A	A	Ampere
		Av	<i>average</i> = Mittelwert
B	Bp	Basenpaar
C	°C	Grad Celsius
D	Da	Dalton
G	g	Gramm
H	h	Stunde
I	IR	Infrarot
K	k	Kilo (10^3)
L	λ	lambda, Wellenlänge
		l	Liter
M	μ	Mikro (10^{-6})
		m	Milli (10^{-3})
		m	Meter
		M	Molar
		max	maximal
		min	Minute
		mol	Mol, Stoffmenge
		MTP	Mikrotiterplatte
N	n	Nano (10^{-9})
		N	Normalität
O	OD	Optische Dichte
P	p	Pico (10^{-12})
		pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

Abkürzungsverzeichnis

R	rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
		RT	Raumtemperatur
S	s	Sekunden
U	U	Unit (Enzymeinheit)
		üN	Über Nacht
		UV	Ultraviolett
V	V	Volt
W	w/w	Masse/Masse
		w/v	Masse/Volumen

Organismenbezeichnung und weiter Abkürzungen

		293T	humane embryonale Nierenepithelzelllinie
A	A.	<i>Acholeplasma</i> (EDWARD&FREUNDT, 1970)
		A549	humane Lungenkarzinomzelllinie
		AMV	aviäres Myeloblastosis Virus
C	CMV	Cytomegalievirus
E	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (CASTELLANI&CHALMERS, 1919)
F	FPV	<i>Fowl plague</i> Virus, Geflügelpest,
			A/Huhn/Rostock/1934 (H7N1)
		FPVmut	attenuierte Variante des A/Huhn/Rostock/1934 (H7N1)
M	<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i> (NOWAK, 1929)
		MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i> , Hundenierenzelllinie
N	NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
P	PR8	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
		PEI	Paul-Ehrlich-Institut
S	SPF	<i>Specific pathogen free</i> , spezifiziert pathogenfreier Status
T	Taq	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
		Tgo	Polymerase aus <i>Thermococcus gorgonarius</i>
V	<i>V.c.</i>	<i>Vibrio cholerae</i> (PACINI, 1854)
		Vero	Nierenzelllinie der grünen Meerkatze
W	WHO	Weltgesundheitskommission

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1 Zusammenfassung

Influenza-A-Viren lösen beim Menschen hochansteckende Infektionen der Atemwege aus, die in Abhängigkeit des Immunstatus der Person und der Pathogenität des Virus unterschiedlich schwere Krankheitsverläufe nehmen können. Eine Impfung bietet hierbei den effektivsten Schutz vor einer Infektion und den damit einhergehenden gesundheitlichen Komplikationen. Zum jetzigen Zeitpunkt erfolgt die Herstellung der Impfstoffe überwiegend in embryonierten Hühnereiern, jedoch zunehmend auch in zellkulturbasierten Vermehrungssystemen (MDCK- und Vero-Zellen). Einer der wichtigsten limitierenden Faktoren für die ausreichende Impfstoffversorgung der Bevölkerung stellt dabei die erzeugbare Antigenausbeute dar, die abhängig von dem eingesetzten Saatvirus stark variabel sein kann. Insbesondere bei neu auftretenden pandemischen Viren, wie z.B. denen der H1N1-Pandemie 2009 sowie den H5N1-Isolaten, sind die erzielbaren Antigenmengen häufig sehr niedrig.

In dieser Arbeit wurde mit dem Fokus höhere Antigenausbeuten zu erzielen, die Eignung der apathogenen, attenuierten Variante FPVmut des hochpathogenen aviären Influenzastammes A/Huhn/Rostock/1934 (H7N1) als neuer, alternativer Akzeptorstamm für die Generierung der Impfstoffsaatviren im Vergleich zu dem gegenwärtig durch die WHO empfohlenen humanen H1N1-Stamm A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) analysiert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Inkorporation des zu den Oberflächenantigenen Hämagglutinin und Neuraminidase (HA und NA) homologen M-Gens in die Saatviren untersucht. Hierzu wurden mittels des Reversen-Genetik-Systems Doppel-Reassortanten (HA+NA) sowie Triple-Reassortanten (HA+NA+M) in den beiden zu vergleichenden Akzeptorstämmen hergestellt. Bei dieser Reassortierungsmethode kann die genetische Zusammensetzung der zu erzeugenden rekombinanten Viren vorab gezielt festgelegt werden, da die Virusgenerierung ausschließlich ausgehend von klonierter cDNA erfolgt. Hierzu werden acht für die Gensegmente kodierenden Plasmide in Zellen transfiziert. Als Donorviren wurden sowohl saisonale Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 als auch (potenziell) pandemische Isolate der Subtypen H1N1pdm09, H5N1 und H9N2 eingesetzt.

FPVmut zeichnet sich bei Vermehrung in embryonierten Hühnereiern sowie MDCK- und Vero-Zellen durch identische Ausbeuten im Vergleich mit dem aufgrund seiner guten Wachstumseigenschaften für die Erzeugung von Influenzasaatviren standardmäßig eingesetzten PR8-Isolat aus. Zusätzlich erwiesen sich beide Hintergrundstämme

grundsätzlich als gleichermaßen geeignet für die Erzeugung rekombinanter Viren, da mit ihnen im selben Zeitrahmen ein identischer Satz an Reassortanten erzeugt werden konnte. Bei der Untersuchung der Replikationseigenschaften zeigte sich, dass bei den Viren mit dem FPVmut-Hintergrund eine produktive MDCK-Zellinfektion zu früheren Zeitpunkten einsetzte und ergänzend bei den aviären Donor-Isolaten eine gesteigerte Infektionsausbreitung beobachtet werden konnte. Kein wesentlicher Unterschied war in der NA-Ausbeute oder der Virusmorphologie in Abhängigkeit von dem Hintergrundstamm oder der genetischen Zusammensetzung festzustellen.

Bei Verwendung des aviären H5N1 konnte eine deutliche Steigerung der Antigenausbeute im Hühnerei- und noch signifikanter im Vero-Anzuchtssystem erzielt werden, wodurch sich für dieses potenziell pandemische Isolat das FPVmut als ein leistungsfähigerer Akzeptorstamm im Vergleich zu dem PR8-Standardsystem herausstellte. Hierbei wurden sowohl höhere gemittelte als auch maximal erreichbare HA-Titer sowie höhere absolute HA-Antigenmengen in der Allantoisflüssigkeit infizierter Hühnereier gemessen. Bei der Vermehrung in Vero-Zellen wurden in den Doppel-Reassortanten nach einer 72-stündigen Inkubation 3fach höhere HA-Antigenmengen im FPVmut Akzeptorstamm erhalten.

Im Falle des H9N2-Isolates bewirkte die Inkorporation des homologen M-Gensegmentes im FPVmut-Hintergrund eine Steigerung der Antigenausbeute um den Faktor 1,5. Auch bei dem H1N1pdm09-Isolat wurden die höchsten Einzelwerte der HA-Ausbeuten nach Inkorporation des M-Gensegmentes im PR8-Hintergrund gemessen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich isolatabhängig Triple-Reassortanten als sinnvolle Variation der genetischen Zusammensetzung der Saatviren eignen können und die Verwendung eines aviären Akzeptorstammes zu einer deutlichen Steigerung der erzielbaren HA-Antigenausbeute in unterschiedlichen Vermehrungssystemen führen kann.

2 Einleitung

2.1 Influenza-A-Viren

Influenza ist beim Menschen eine hochansteckende virale Infektion der Atemwege. Sie wird durch segmentierte RNA-Viren ausgelöst und tritt außer im humanen Wirt auch in unterschiedlichen Tierarten auf. Die Übertragung erfolgt primär über Aerosole [1]. Zu den Symptomen gehören Fieber, Husten, Hals-, Muskel- und Kopfschmerzen. Die Infektion kann, beeinflusst durch unterschiedliche Faktoren sowohl auf Seiten des Virus als auch des Wirts, entweder vollständig asymptomatisch verlaufen oder aber zu schweren Krankheitsverläufen mit gegebenenfalls tödlichem Ausgang führen. Der beste Schutz vor einer Ansteckung besteht in der prophylaktischen jährlichen Impfung.

2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Influenzaviren, die sich in die Typen A, B und C unterteilen, bilden gemeinsam mit den Thogoto- und den Isaviren die Familie der *Orthomyxoviridae* [2;3]. Es handelt sich hierbei um lipidumhüllte Viren mit einem einzelsträngigen, segmentierten RNA-Genom in Negativstrangorientierung [4]. Die Influenza-A-Viren untergliedern sich anhand ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Subtypen, die sich untereinander im Homologie-Grad ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Antigenität unterscheiden. Derzeit existieren 17 HA- (H1-17) und 10 NA-Subtypen (N1-10), inklusive der 2012 in Guatemala in Fledermäusen entdeckten neuesten Variante H17N10 [5-7]. Die Bezeichnung der Viren erfolgt seit 1980 auf Initiative der WHO durch Angabe des Virustyps (A oder B), gefolgt von der Wirtspezies (entfällt bei humanen Isolaten), dem Isolierungsort, der Isolatnummer, dem Jahr und in Klammern dem zugehörigen Subtyp, z.B. A/Huhn/Rostock/1934 (H7N1) [8].

2.1.2 Virusaufbau und Genomorganisation

Die Influenza-A-Viruspartikel sind pleomorph und man unterscheidet zwischen sphärischen und filamentösen Virionen mit einem Durchmesser von ca. 80-120 nm [9]. In der von der Wirtszelle abstammenden Lipidhülle sind die transmembranen, glykosylierten trimeren HA- und tetrameren NA-Proteine sowie das tetramere Ionenkanalprotein M2 integriert [5]. Das Matrixprotein (M1) besitzt eine wichtige Schlüsselfunktion in der Assemblierung der Viruspartikel. Es bildet durch Homo-Oligomerisierung eine Proteinschicht an der Innenseite des Virions und interagiert über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran [9;10].

Zusätzlich bindet es einerseits an den cytoplasmatischen Bereich der HA-, NA- und M2-Proteine und andererseits an die Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) [11-13]. Die RNPs bestehen aus der viralen RNA (vRNA), die mit den Nukleoproteinen (NP) und dem Polymerasekomplex assoziiert ist. Letzterer setzt sich aus den drei nichtkovalent gebundenen Untereinheiten Polymerase basisch 1 und 2 (PB1, PB2) und aus der Polymerase azide (PA) zusammen. Eine schematische Übersicht über den Aufbau eines Influenza-A-Viruspartikels findet sich in der Abbildung 2-1.

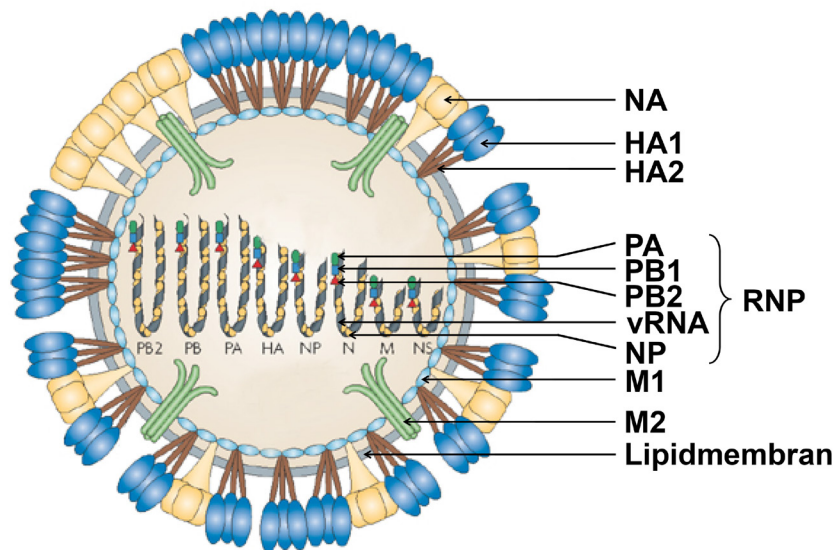


Abbildung 2-1 Schematischer Aufbau eines Influenza-A-Viruspartikels

Detaillierte Erläuterungen zum Aufbau eines Influenzavirions befinden sich im Text. Abbildung geringfügig modifiziert nach [14]

Neben den Strukturproteinen besitzen Influenza-A-Viren mehrere Nichtstrukturproteine, die z. T. die Genregulation der infizierten Wirtszelle beeinflussen können. Das multifunktionale Nichtstrukturprotein 1 (NS1) agiert u.a. als Interferonantagonist, indem es an den zellulären Transkriptionsfaktor NFκB bindet und dadurch die Expression der antiviral wirkenden Interferon-Gene verhindert [4;15]. Das PA-X-Protein inhibiert über seine mRNA Endonuklease Aktivität die Expression einer Reihe unterschiedlicher zellulärer Gene, die z.B. proinflammatorisch wirken oder eine Rolle in der antiviralen Immunabwehr spielen [16;17]. Das zweite auf dem NS-Gensegment kodierte Nichtstrukturprotein (NS2) ist am Export der neugebildeten RNPs aus dem Zellkern in das Zytoplasma beteiligt und wird daher auch als NEP (*nuclear export protein*) bezeichnet [18;19]. Bei dem proapoptotischem PB1-F2 [20] handelt es sich um einen Virulenzfaktor, der nicht bei allen Influenzaisolaten vorhanden ist. Er wird auf demselben Gensegment kodiert wie das PB1-N40, welches die Virusreplikation beeinflusst, indem es das Gleichgewicht der Expression zwischen PB1 und PB1-F2 reguliert [21;22]. Zu den 2012 beschriebenen neuesten Influenzaproteinen gehört neben dem PA-X auch das NS3. Es wurde im Zusammenhang mit der Adaption eines humanen Virus an die

Maus entdeckt und führte zu einer gesteigerten Replikation im neuen Wirt [23]. Weiterhin wurde kürzlich das M42-Protein beschrieben, welches im Falle des Verlustes des M2-Proteins dessen Funktionen kompensiert [24]. Eine Aufstellung aller Gensegmente des A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) Isolates und dessen Proteine sowie deren Funktionen befindet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht der Gensegmente sowie der Proteine und deren Funktionen des PR8-Isolates A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)

Die Länge der acht Gensegmente ist in Basenpaaren [bp] angegeben, die der Proteine in Aminosäuren [AS]. Modifiziert nach [4;25]

Segment	Länge [bp]	Protein	Länge [AS]	Eigenschaften/Funktion
1	2341	PB2	759	<ul style="list-style-type: none"> Polymerasekomplex-Untereinheit Bindung von 5' Cap-Strukturen
2	2341	PB1	757	<ul style="list-style-type: none"> Polymerasekomplex-Untereinheit RNA-abhängige RNA-Polymerase Endonukleaseaktivität
		PB1-F2 ¹	87	<ul style="list-style-type: none"> Apoptose-Induktion (Virulenzfaktor)
		PB1-N40 ²	718	<ul style="list-style-type: none"> Regulation der RNA-Polymeraseaktivität von PB1
3	2233	PA	716	<ul style="list-style-type: none"> Polymerasekomplex-Untereinheit Rolle für den Zusammenbau des Polymerasekomplexes
		PA-X ³	252	<ul style="list-style-type: none"> Regulierung der Wirtszellexpression
4	1778	HA	550	<ul style="list-style-type: none"> Rezeptorbindung (HA₁) Membranfusion (HA₂) Induktion neutralisierender Antikörper
5	1565	NP	498	<ul style="list-style-type: none"> Enkapsidierung der vRNA und cRNA (RNPs) Kernimport der RNPs über Lokalisationssignal (NLS)
6	1413	NA	454	<ul style="list-style-type: none"> Enzymatische Entfernung der Rezeptoren auf der Oberfläche infizierter Zellen Verhinderung der Aggregation neugebildeter Virionen Induktion neutralisierender Antikörper
7	1027	M1	252	<ul style="list-style-type: none"> Matrixprotein Virusmorphogenese Kernexport der RNPs
		M2 ⁴	97	<ul style="list-style-type: none"> Protonenkanal Freisetzung der RNPs aus Endosomen
		M42 ²⁺⁴	99	<ul style="list-style-type: none"> Kompensation der M2 Funktion
8	890	NS1	230	<ul style="list-style-type: none"> Interferonantagonist Inhibition des Spleißens, Polyadenylierung und Kernexport zellulärer mRNAs
		NS2/NEP ⁴	121	<ul style="list-style-type: none"> Regulatorisches Protein beteiligt am nukleärem Export der RNPs

¹alternativer Leserahmen

²alternatives Startcodon

³Ribosomen vermittelte Leserahmenverschiebung [26]

⁴Splice-Variante

Das Genom der Influenza-A-Viren besteht aus acht einzelsträngigen RNA-Segmenten (siehe Tabelle 1), die aufgrund ihrer negativen Orientierung nicht infektiös sind und zunächst in die mRNA (*messenger* RNA) umgeschrieben werden müssen. An den Enden jedes Genomsegmentes befinden sich hochkonservierte, nichtkodierende Bereiche, die am 3'-Ende aus zwölf und am 5'-Ende aus dreizehn Nukleotiden bestehen [27]. Hieran anschließend befinden sich die segmentspezifischen Bereiche, die zwischen den unterschiedlichen Gensegmenten variieren und – mit Ausnahme des NA-Gensegmentes – über die unterschiedlichen Influenzasubtypen hochkonserviert sind [28]. Während der Infektion (siehe 2.1.3) werden von der vRNA sowohl die mRNA transkribiert, als auch die als Matrize für die Replikation verwendete komplementäre RNA (cRNA) synthetisiert (siehe Abbildung 2-2).

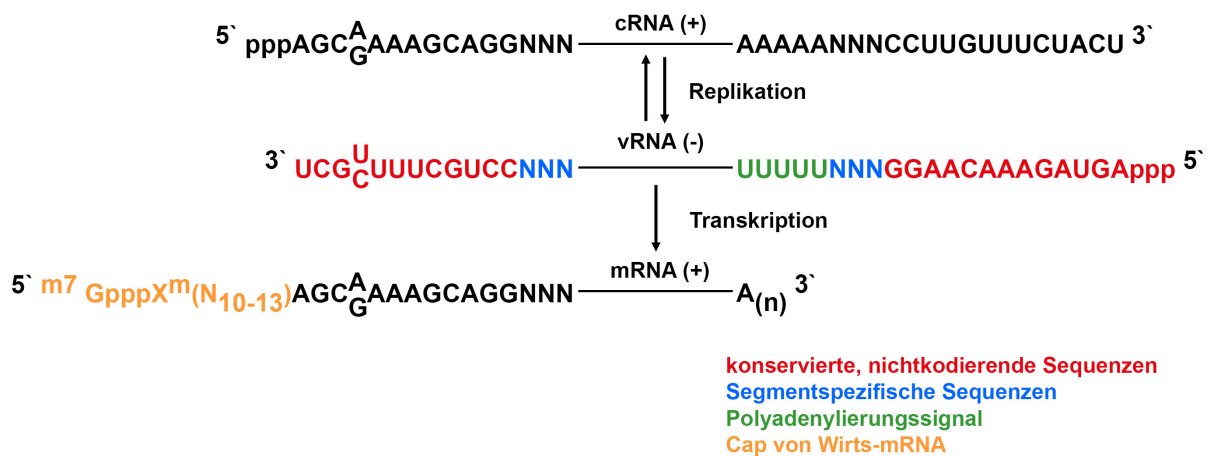


Abbildung 2-2 Übersicht der verschiedenen RNA-Moleküle der Influenza-A-Viren

Am jeweiligen Ende der viralen RNA-Genomsegmente (vRNA) befinden sich die konservierten, nichtkodierenden Sequenzen (rot) an welche die jeweiligen segmentspezifischen Sequenzen (blau) anschließen. Das 5-7 Basen lange Polyadenylierungssignal ist in grün dargestellt. Ausgehend von der vRNA wird die Boten-RNA (mRNA) transkribiert. Diese trägt an ihrem 5' Ende die von der Wirtszellen mRNA entfernte Cap-Struktur (gelb). Für die Replikation wird eine zur vRNA komplementäre Matrize (cRNA) synthetisiert. Modifiziert nach [29].

Nach bisherigem Kenntnisstand sind die Gensegmente 1, 4, 5 und 6 monocistronisch, das Gensegment 3 ist bicistronisch und die restlichen Segmente kodieren für je drei Genprodukte. Influenzaviren besitzen unterschiedliche posttranskriptionelle Prozessierungsmechanismen. Die auf dem Gensegment 2 kodierten Proteine PB1, PB1-F2 und PB1-N40 werden von derselben mRNA translatiert [4]. Aufgrund der Nutzung eines alternativen Startcodons handelt es sich bei dem PB1-N40 um eine um 40 Aminosäuren (AS) aminoterminal verkürzte Form des PB1 [4;21]. Das PB1-F2 wird in einem um eine Base verschobenen Leserahmen translatiert [20]. Das PA- und das PA-X-Protein werden vom

gleichen Startcodon ausgehend translatiert, bevor es bei dem Letzteren nach 191 AS zu einer durch die Ribosomen vermittelten Leserahmenverschiebung kommt [26]. Das NS2/NEP sowie das NS3-Protein entstehen durch Spleißen der mRNA [23;30]. Bei dem M2 und dem M42 handelt es sich ebenfalls um Spleißvarianten, die jedoch verschiedene, in unterschiedlichen Leserahmen befindliche, Startcodons nutzen. Nach dem Spleißen werden die beiden Proteine vom gleichen Leserahmen translatiert [24], was zur Folge hat, dass deren carboxyterminal kodierte Transmembrandomänen identisch sind, während sich die Proteine in ihren aminoterminal kodierten Ektodomänen voneinander unterscheiden.

2.1.3 Infektionszyklus

Der erste Schritt der Infektion besteht in der Adsorption der Viruspartikel über ihre HA-Proteine an sialinsäurehaltige Rezeptoren auf den Oberflächen der Epithelzellen. Aviäre Influenzaviren bevorzugen Rezeptoren, bei denen die N-Acetyl-Neuraminsäurereste über eine $\alpha(2,3)$ -Verknüpfung an den Galaktoserest der Oligosaccharidseitenketten der glykosylierten Membranproteine und Lipide gebunden sind. Die humanadaptierten Viren hingegen zeigen eine Präferenz für Rezeptoren mit $\alpha(2,6)$ -glykosidisch verknüpften Sialinsäureresten. Diese unterschiedliche Bindungsspezifität wird durch die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren im Bereich der Rezeptorbindungsstelle des HA-Proteins festgelegt und kann innerhalb eines Subtyps variieren [4;31-33].

Nach der Rezeptorbindung werden die Viren über Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Für die Freisetzung der RNPs in das Zytoplasma sind zwei voneinander unabhängige pH-induzierte Schritte notwendig [34]. Der erste ist die Lockerung der Interaktion zwischen den M1-Proteinen und den RNPs [4;35-37]. Hierfür wird durch den Transport der Protonen aus dem Endosomen über das M2 Ionenkanalprotein der pH-Wert im Virusinneren gesenkt [38]. Der zweite pH-abhängige Schritt ist die Verschmelzung der Endosomenmembran mit der Virusmembran. Voraussetzung für diese Membranfusion ist die proteolytische Aktivierung des HA₀-Vorläuferpolypeptids, welches hierbei in seine über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleibenden Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten wird [39-41]. Im Endosomen induziert der dort vorliegende saure pH-Wert dann die Konformitätsumlagerung des gespaltenen HA-Proteins [42;43], wodurch das aus 20 Aminosäuren bestehende, aminoterminal Fusionspeptid der HA₂-Untereinheit exponiert wird. Dieser hydrophobe Abschnitt lagert sich in die Lipiddoppelschicht des Endosomenvesikels ein und induziert die Verschmelzung der beiden Membranen [33]. Die Aminosäuresequenz des HA-Proteins an der Spaltstelle legt fest, durch welche Protease-Klassen die Prozessierung des HA₀-Proteins erfolgt und ist ein wesentlicher

Pathogenitätsfaktor der Influenzaviren [44;45]. Besitzt die Erkennungssequenz eine oder zwei basische Aminosäuren, wird diese von den trypsinähnlichen Proteasen im humanen Respirations- bzw. aviären Gastrointestinaltrakt erkannt und die Spaltung des HA-Proteins erfolgt extrazellulär nach Freisetzung der neu gebildeten Virionen [46;47]. Handelt es sich hingegen um eine multibasische Sequenz mit mehreren hintereinanderliegenden basischen Aminosäuren [48;49], kann das Motiv durch die furinähnlichen Proteasen schon intrazellulär prozessiert werden und die neu gebildeten Viren sind bereits bei der Freisetzung infektiös. Diese Protease-Klasse ist ubiquitär in allen Geweben vorhanden, wodurch die Aktivierung der Virionen nicht auf ein lokales Gewebe begrenzt ist. Die Infektion kann sich somit systemisch im gesamten Wirt ausbreiten und nimmt im schlimmsten Fall einen letalen Ausgang. Das Auftreten dieser hochpathogenen Viren mit einer multibasischen HA-Spaltstelle wurde bisher nur für den H5- und den H7-Subtyp beschrieben [29].

Aus dem Zytoplasma gelangen die RNPs in den Zellkern, wo Transkription und Replikation stattfinden. Die Translation der viralen mRNAs erfolgt im Zytoplasma. Neu synthetisierte Proteine werden entweder zur apikalen Zelloberfläche (HA, NA und M2) oder zurück in den Nukleus (PB1, PB2, PA, M1, NS2, NP) transportiert. Bei den beiden Oberflächenproteinen HA und NA handelt es sich um Glykoproteine, die gemeinsam mit dem M2 am rauen Endoplasmatischen Reticulum translatiert werden und deren posttranslationalen Modifikationen sowie der Transport zur Membranoberfläche über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk erfolgen. Bei der Replikation wird zunächst die vRNA in eine komplementäre cRNA umgeschrieben, die als Matrize für die Synthese neuer Influenzagenome dient. Für den Transport der neu gebildeten RNPs ins Zytoplasma interagiert das NS2 mit den M1-komplexierten RNPs, wodurch es zur Anlagerung des zellulären Exportins CRM1 (*chromosome region maintenance 1 protein*) und zum Transport durch die Nukleopore der Kernmembran ins Zytoplasma kommt [4;18]. Von dort gelangen die RNPs an die Zellmembran, in die bereits die HA-, NA- und M2-Proteine integriert sind. Die anschließende Assemblierung wird durch die Interaktion der M1-Proteine mit den cytoplasmatischen Abschnitten der viralen Oberflächenproteine koordiniert und die neu gebildeten Virionen werden dann durch Knospung von der Zelloberfläche freigesetzt [5;50-52]. Zur Verhinderung sowohl einer Reinfektion der bereits infizierten Zelle als auch der Akkumulation der neu gebildeten Viruspartikel untereinander oder an die Membranbestandteile zerstörter Zellen, entfernt die Neuraminidase die Rezeptoren auf den Oberflächen der infizierten Zellen und der Viren durch die enzymatische Abspaltung der endständigen Neuraminsäurereste [5;53;54]. Die neu gebildeten Viruspartikel können daher nur an noch nicht infizierte Nachbarzellen binden und die ursprünglich infizierte Zelle wird im

Verlauf der Infektion zerstört. Eine schematische Übersicht über die einzelnen Schritte des Infektionsablaufs zeigt Abbildung 2-3.

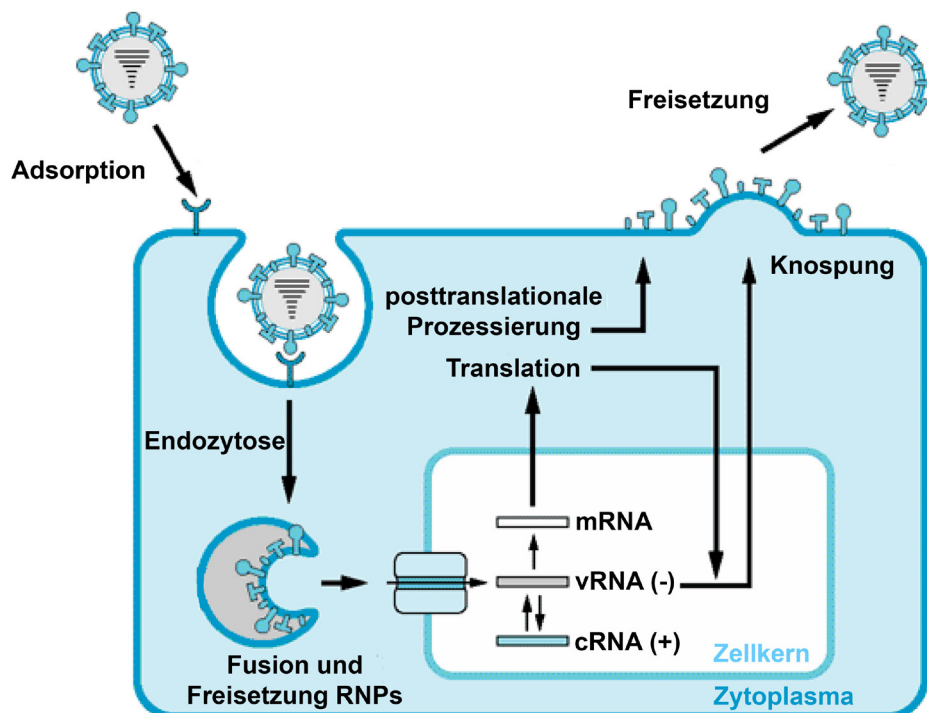


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung eines Infektionszyklus der Influenza-A-Viren

Der Influenzainfektionszyklus gliedert sich in folgende Schritte: Adsorption, Endozytose, Membranfusion und Freisetzung der RNPs mit anschließendem Transport in den Nukleus. Dort erfolgen die Transkription und die Replikation. Die Translation neuer viraler Proteine findet im Zytoplasma statt. Die Assemblierung der Virionen erfolgt an der apikalen Epitheloberfläche, von wo aus sie durch Abschnürung freigesetzt werden und weitere Zellen infizieren können. Geringfügig modifiziert nach [5].

2.1.4 Wirtsspektrum und Übertragungswege

Influenza-A-Viren können neben dem Menschen auch viele unterschiedliche Säuger und Vogelarten infizieren (siehe Abbildung 2-4), wobei nicht alle Subtypen in allen Wirten gleichermaßen auftreten. Das ursprüngliche Reservoir für alle Influenzaviren bilden wildlebende Wasser- und Seevögel wie z.B. Enten, Gänse, Meerschwalben, Sturmtaucher und Möwen [55], von denen in aller Regel die Übertragung auf die anderen Arten erfolgt. Hierbei zeigen Influenzaviren einen ausgeprägten Wirtstropismus. Ein wichtiger Aspekt dieser Speziesbarriere ist die grundsätzlich unterschiedliche Rezeptorpräferenz der aviären und der human adaptierten Influenzaviren (siehe 2.1.3). Aviäre Isolate nutzen $\alpha(2,3)$ -verknüpfte Neuraminsäurereste, die sich bei den Vögeln auf den Epithelien des Gastrointestinaltrakts befinden. Die Übertragung zwischen den Tieren erfolgt über die fäkal-orale Route [29]. Beim Menschen hingegen findet die Virusreplikation im Respirationstrakt

statt. Die Epithelzellen im Bereich der oberen Atemwege, darunter der Bereich der Nasenhöhle, des Rachens, der Luftröhre und der Bronchien, tragen hauptsächlich $\alpha(2,6)$ -glykosidische Sialinsäureverbindungen [56]. Diese Bereiche sind für die aerogen übertragbaren humanen Viren gut zugänglich und ermöglichen eine effiziente Weitergabe zwischen den Wirten. Die Wirtsspezifität ist jedoch nicht absolut, da es gelegentlich zu sporadischen Übertragungen nicht adaptierter aviärer Viren auf den Menschen kommt, wie es bereits für die Subtypen H9N2, H5N1 und H7N7 beobachtet wurde [57-59]. Eine mögliche Ursache für die Überschreitung der Wirtsbarriere besteht in der direkten Infektion der Typ II Pneumozyten der Alveolarepithelzellen im unteren humanen Respirationstrakt, die auf ihrer Oberfläche auch die aviären $\alpha(2,3)$ -glykosidischen Rezeptoren tragen [56]. Neben den sporadischen Infektionen mit unterschiedlichen Subtypen haben sich bisher nur Linien der H1N1-, H3N2- und H2N2-Subtypen dauerhaft im Menschen etablieren können [60].

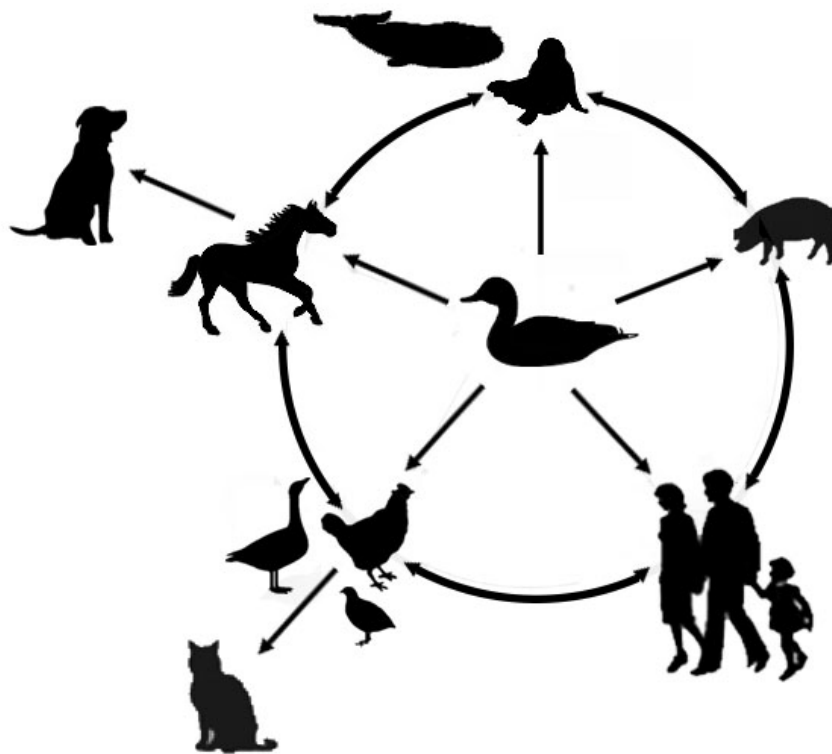


Abbildung 2-4 Wirtsspektrum und mögliche Übertragungswege der Influenza-A-Viren

Wildlebende Wasser- und Seevögel stellen das natürliche Reservoir aller Influenzaviren dar, von wo aus die Viren auf domestiziertes Geflügel, wie z.B. Hühner, Gänse oder Wachteln übertragen werden. Influenza-A-Viren können in unterschiedlichen Säuger-Arten auftreten, darunter Meeressäuger, Pferde, Schweine, Hunde, Katzen und Menschen. Zwischen den unterschiedlichen Spezies besteht jedoch eine Wirtsbarriere, die in aller Regel nicht ohne vorherige Adaption der Viren an den neuen Wirt überschritten werden kann. Modifiziert nach [29;55;61;62]

Nach der erfolgreichen Übertragung auf einen neuen Wirt besitzen Influenzaviren unterschiedliche Mechanismen, um sich den veränderten Gegebenheiten anzupassen. Die relative hohe Fehlerrate der viralen Polymerase bedingt eine verhältnismäßig hohe Mutationsrate, die den Erwerb neuer genetischer Eigenschaften durch zufällig eingefügte Punktmutationen während der Replikation fördert. Sind hiervon Antigenstrukturen betroffen, können sich die Viren dadurch der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes entziehen. Dieses Phänomen der graduellen Veränderung wird als Antigendrift bezeichnet. Eine weitere Option zur Wirtsadaption ist die Reassortierung, bei der einzelne oder mehrere Gensegmente zwischen verschiedenen Viren ausgetauscht werden. Sind hierbei die für die Oberflächenproteine kodierenden Gensegmente betroffen, kommt es bei dem als Antigen shift bezeichneten Vorgang zu einer Veränderung der antigenen Eigenschaften und gegebenenfalls zu einem Austausch der Rezeptorpräferenz [63;64]. Voraussetzung für die Reassortierung ist die parallele Infektion einer Zelle mit mindestens zwei unterschiedlichen Viren. Das Schwein spielt in diesem Anpassungsvorgang eine wichtige Rolle, da die Tiere sowohl Rezeptoren mit $\alpha(2,3)$ - sowie mit $\alpha(2,6)$ -glykosidisch verknüpften Sialinsäureresten besitzen [63]. Die Wahrscheinlichkeit einer parallelen Koinfektion einer Zelle mit aviären und humanen Viren und die damit verbundene Möglichkeit des Austausches von Gensegmenten wird somit erhöht [62;65], weshalb Schweine auch als sogenannte *mixing vessel* bezeichnet werden [66].

Südostasien, insbesondere China, ist ein Epizentrum für die Entstehung neuer pandemischer Viren [67]. Ursache ist das Zusammentreffen unterschiedlicher Faktoren, darunter die hohe Influenzaprävalenz, der enge räumliche Kontakt zwischen Mensch und Geflügel und die nicht immer optimalen hygienischen Bedingungen. Die Verbreitung der Viren erfolgt von dort ausgehend über Zugvögel [68] sowie über Menschen im Rahmen der zunehmenden Globalisierung und der damit verbundenen Mobilität [69].

2.1.5 Klinische Manifestation beim Menschen

Die saisonale Influenza ist beim Menschen eine hochansteckende Infektion [70] der Atemwege mit jährlichen, vor allem in den Wintermonaten auftretenden, unterschiedlich schwer verlaufenden Epidemien. Nach einer ein- bis fünftägigen Inkubationszeit setzen für einen Zeitraum von ca. 3-7 Tagen akute Symptome wie Kopf-, Hals-, Muskel- und Gliederschmerzen, Schwäche, Husten und schnell steigendes Fieber bis 41 °C ein [71]. Komplikationen, die zu schwerwiegenden Infektionen mit letalem Ausgang führen, treten primär bei Risikopatienten auf, zu denen beispielsweise immunsupprimierte, chronisch erkrankte oder ältere Menschen zählen [63]. Eine mögliche Schwierigkeit bereitet das

Auftreten einer viralen interstitiellen Pneumonie, bei der das Epithel der Alveolar- und Bronchialwänden zum Teil vollkommen zerstört wird und es zu Nekrosen und Blutungen kommt [4]. Bei schweren Krankheitsverläufen kann es des Weiteren zu dauerhaften Schädigungen des Herzens oder der Nieren kommen.

Die durch die Influenzaviren geschädigte Epithelbarriere erleichtert zusätzlich eine Infektion mit weiteren Pathogenen wie beispielsweise *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* [72]. Diese Bakterien lösen zum einen eine sekundäre Pneumonie aus und nehmen zum anderen direkt Einfluss auf den Verlauf der primären Influenzainfektion, indem sie zur Aktivierung der Infektiosität der Viren beitragen können. Wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, muss für die Fusion der viralen und der Endosomenmembran das HA-Protein proteolytisch gespalten werden. Diese notwendige Prozessierung kann durch die bakteriellen Proteasen erfolgen [73].

2.1.6 Das Reverse-Genetik-System zur Erzeugung rekombinanter Influenzaviren

Die klassische Herstellung rekombinanter Influenzaviren erfolgt durch eine parallele Infektion der miteinander zu kombinierenden Viren und die daraus resultierende Viruspopulation ist aufgrund der unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Gensegmente heterogen. Um die Reassortante mit der gewünschten Genkombination von den anderen Viren zu isolieren, muss im Anschluss eine spezifische Selektion (z.B. mittels Antiserum) erfolgen.

Das von Neumann *et al.* 1999 publizierte Reverse-Genetik-System [74] ist eine Methode, die es ermöglicht, rekombinante Viren ausschließlich anhand klonierter cDNA zu generieren. Hierbei entsteht eine homogene Viruspopulation mit einer zuvor festgelegten genetischen Zusammensetzung. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, gezielt Mutationen zur Untersuchung genetischer Merkmale einzuführen oder pathogene Eigenschaften, wie z.B. die multibasische HA-Spaltsequenz, vor Erzeugung der Viren zu entfernen. Neben der schnellen Generierung der Viren mit spezifischen genetischen Eigenschaften besteht für die Impfstoffproduktion ein weiterer Vorteil darin, dass die Saatvirenherstellung nicht direkt aus klinisch gewonnenem Probenmaterial erfolgt, sondern durch Einbau eines auf Nukleinsäure basierenden Zwischenschritts potenzielle Kontaminationen eliminiert werden [75;76].

Für das Reverse-Genetik-System [74;77] werden zur Erzeugung der rekombinanten Influenzaviren zwölf Plasmide benötigt, davon acht RNA-Polymerase I (Pol) Plasmide für die Bereitstellung der vRNA Gensegmente und vier RNA-Pol II Expressionsplasmide für die Erzeugung der Proteine des minimalen Replikationskomplexes, bestehend aus den drei

viralen Polymerasen und den NP-Proteinen (siehe Abbildung 2-5 A). Die Expressionsplasmide basieren auf dem kommerziell erhältlichen pcDNA3-Vektor der Firma Invitrogen, bei dem die Gensegmente von einem Cytomegalovirus (CMV) Promotor und einem Polyadenylierungssignal flankiert werden (siehe Abbildung 2-5 B). Die sogenannten pHH21 RNA-Pol I Plasmide dienen als Matrize für die Herstellung der vRNAs und tragen neben dem humanen RNA-Pol I Promotor einen murinen RNA-Pol I Terminator, welcher auch durch das Hepatitis-D-Virus Ribozym ersetzt werden kann [78]. Alle zwölf Plasmide werden in humane 293T-Zellen kotransfiziert, wodurch in der Zelle sowohl die viralen Polymerase- und die NP-Proteine als auch die synthetisierten vRNAs zur Verfügung stehen, somit alle Komponenten, die für eine produktive Influenzainfektion benötigt werden. Die in den transfizierten Zellen neu gebildeten Viren werden in das Zellkulturmedium abgegeben und können weitere Zellen infizieren. Zur anschließenden Vermehrung der rekombinanten Viren werden MDCK-Zellen mit dem Zellüberstand der 293T-Zellen infiziert. Der Einsatz zweier unterschiedlicher Zelllinien resultiert daher, dass die im ersten Schritt verwendeten 293T-Zellen sich sehr gut transfizieren lassen und zusätzlich aufgrund ihres humanen Ursprunges die RNA-Polymerasen I den humane Promotor der pHH21-Plasmide erkennen. Im zweiten Schritt erfolgt die Vermehrung der generierten rekombinanten Viren in caninen MDCK-Zellen, da diese Zelllinie effizient die Virusbildung unterstützt und mit ihnen deutlich höhere Virustiter generiert werden können als mit den 293T-Zellen.

Im Zuge einer Weiterentwicklung des 12-Plasmid-Systems entstand das 8-Plasmid-System, für das der bidirektionale pHW2000 Vektor entworfen wurde [79]. Die Influenza-Gensegmente werden hierbei von einem humanen RNA-Pol I Promotor und einem murinen RNA-Pol I Terminator eingerahmt und die gesamte Kasette von einem verkürzten CMV RNA-Pol II Promotor und einer Polyadenylierungssequenz flankiert (siehe Abbildung 2-5 B). Dieser Aufbau des Plasmids ermöglicht es den RNA-Polymerasen I die vRNA zu synthetisieren und in der gegengesetzten Orientierung den RNA-Polymerasen II die mRNA zu transkribieren. Hierdurch entfällt die Notwendigkeit der Bereitstellung zusätzlicher Expressionsplasmide.

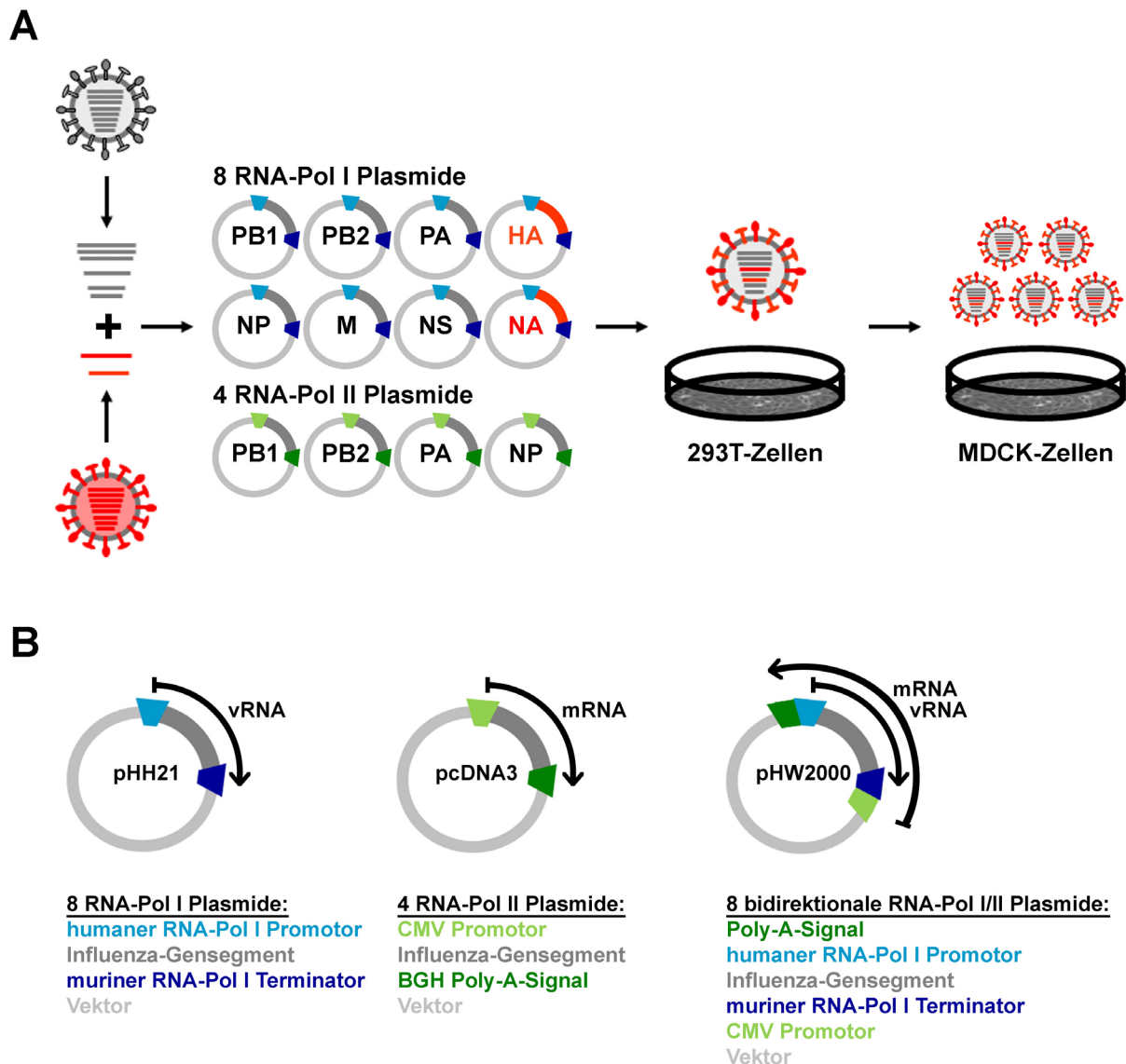


Abbildung 2-5 Das Reverse-Genetik-System zur Herstellung rekombinanter Influenzaviren

(A) Schematische Darstellung des Reversen-Genetik-Systems nach Neumann *et al.* [77]. Zur Erzeugung der rekombinanten Influenzaviren werden die RNA-Gensegmente reverse in cDNA transkribiert, wobei für die Herstellung der Impfstoffsaatviren die Oberflächenproteine des aktuellen Impfstammes (rot) in einen Hintergrundstamm (grau) mit guten Replikationseigenschaften – in der Regel PR8 – eingebracht werden. Die 8 RNA-Pol I Plasmide werden gemeinsam mit vier RNA-Pol II Plasmiden in 293T-Zellen transfiziert. Zur Vermehrung der neu entstandenen Viren werden im nächsten Schritt MDCK-Zellen infiziert. (B) Übersicht der im Reversen-Genetik-System verwendeten Plasmide. Ursprünglich wurden zur Erzeugung der Influenzaviren acht pHH21 RNA-Pol I Plasmide gemeinsam mit vier pcDNA3 RNA-Pol II Expressionsplasmide eingesetzt, in der Weiterentwicklung entstand hieraus der bidirektionale pHW2000 Vektor [79].

2.1.7 FPVmut, eine attenuierte Variante des hochpathogenen A/Huhn/Rostock/1934

Das A/Huhn/Rostock/1934 (H7N1) Virus gehört, zusammen mit anderen H5- und H7-Influenzaviren in Kombination mit unterschiedlichen NA-Subtypen, zur Gruppe der

klassischen, hochpathogenen Geflügelpestviren (*fowl plague virus*) [29;80]. Die Klassifizierung der Pathogenität erfolgt anhand mehrerer Kriterien. Ein Aspekt ist der intravenöse Pathogenitätsindex (IVPI), der ermittelt wird, indem adulten Hühnern eine festgelegte Virusmenge intravenös appliziert wird und im Anschluss über einen gewissen Zeitabschnitt das Auftreten der Krankheitssymptome sowie der Todesfälle mit einem standardisierten Punktesystem überwacht wird. Liegt der IVPI über einem Wert von 1,2, ist das Virus als hochpathogen einzustufen [81]. Andere Eigenschaften der hochpathogenen Influenzaviren sind u. a. die trypsinunabhängige Replikation in der Zellkultur und das Vorhandensein einer multibasischen HA-Spaltsequenz [49;82].

Bei der Erzeugung des FPVmut [83], einer attenuierten Variante des A/Huhn/Rostock/1934 (FPV), wurde unter Verwendung des Reversen-Genetik-Systems die multibasische HA-Spaltstelle deletiert (siehe Abbildung 2-6). Die proteolytische Prozessierung des HA-Proteins ist dadurch nicht mehr durch furinähnliche Proteasen möglich und das Virus repliziert in Zellkultur ausschließlich trypsinabhängig. In Hühnerembryonen konnte keine direkte Infektionsausbreitung beobachtet werden, wodurch das FPVmut einen deutlich attenuierten Phänotyp aufwies. Der ermittelte IVPI betrug 0,0 im Gegensatz zu 2,37 beim hochpathogenen wildtypischen FPV [83]. Das FPVmut ist ein nachweislich niedrigpathogenes Virus, entsprechend wurde es durch die ZKBS (zentrale Kommission für Biologische Sicherheit) eingestuft. Aufgrund seines aviären Ursprungs repliziert das FPVmut effizient in embryonierten Hühnereiern, dem derzeit wichtigsten Vermehrungssystem für die Produktion von Influenzaimpfstoffen (siehe 2.2.2) und erzielt zusätzlich hohe Titer bei Anzucht in verschiedenen Zellkultursystemen.

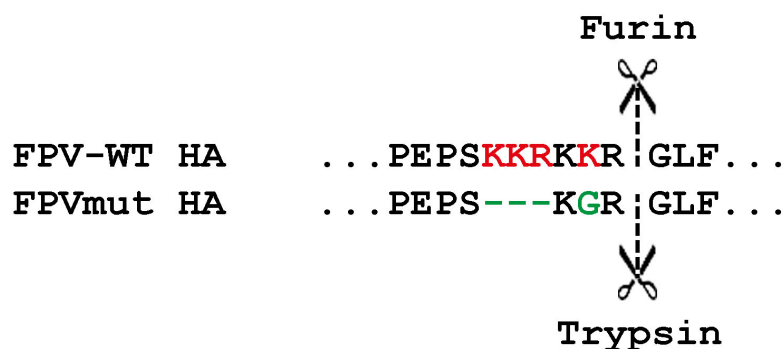


Abbildung 2-6 Aminosäuresequenzvergleich der HA-Spaltstelle des FPV mit dem FPVmut

Die aus mehreren hintereinanderliegenden Lysinen (K) und Argininen (R) bestehende multibasische HA-Spaltstelle des hochpathogenen FPV wurde bei dem niedrigpathogenen FPVmut deletiert und parallel ein Lysin durch ein Glycin (G) ersetzt. Weitere aufgeführte Aminosäuren sind: Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S), Leucin (L) und Phenylalanin (F). Modifiziert nach [83].

2.2 Influenza-Vakzine

Die jährliche prophylaktische Influenzaimpfung ist der effektivste Schutz vor der Ansteckung mit Influenzaviren. Die Schutzimpfung bietet zum einen eine gute individuelle Sicherheit vor einer Erkrankung und zum anderen verhindert eine gute Immunisierung der Bevölkerung eine weitere Ausbreitung der Infektion, wodurch die Krankheitslast sowohl des einzelnen Individuums als auch der Gesellschaft vermindert wird. Im Vergleich zu den wirtschaftlichen Konsequenzen durch krankheitsbedingte Arbeitsausfälle und notwendige Behandlungsmaßnahmen ist die Impfung eine einfache und kosteneffiziente Lösung.

Im Rahmen der saisonalen Influenza-Epidemie treten laut WHO pro Jahr drei bis fünf Millionen schwere Krankheitsverläufe und zwischen 250.000-500.000 Todesfälle weltweit auf [84], von denen ca. 90 % innerhalb der Altersgruppe der über 65-Jährigen liegen [85]. Die wirkliche Anzahl der mit Influenza assoziierten Todesfälle kann jedoch aufgrund der häufigen multifaktoriellen Einflüsse durch bestehende Grunderkrankungen nicht eindeutig ermittelt werden und wird daher statistisch geschätzt [86].

Nach den Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) sollten sich alle Personen gegen Influenza impfen lassen, die über 60 Jahre alt sind oder ein chronisches gesundheitliches Grundleiden aufweisen, welches das Risiko für eine schwere bis tödlich verlaufende Influenzainfektion erhöht [87]. Hierzu zählen beispielweise Erkrankungen der Atemwege, des Herz-Kreislauf-Systems, der Leber, der Nieren, neurologische und Stoffwechselkrankheiten sowie angeborene oder erworbene Immundefekte. Eine Schutzimpfung wird auch für Bewohner von Alten- und Pflegeheimen empfohlen. Zusätzlich wird Personen, die direkten Kontakt zu Geflügel und Wildvögeln haben, die saisonale Impfung nahegelegt, um eine potenzielle Doppelinfektionen mit anderen aviären Isolaten zu verhindern [88]. Eine Impfempfehlung wird seit 2010 auch für schwangere Frauen ab dem 2. Trimester ausgesprochen [89], da sich gezeigt hat, dass sie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung schwerwiegender Krankheitsverläufe tragen. Parallel soll das ungeborene Kind durch die passive Immunisierung über die Mutter geschützt werden [90]. Für gesunde Personen unter 60 Jahren besteht hingegen keine ausdrückliche Impfempfehlung, sofern es sich bei ihnen nicht um eine Infektionsquelle für andere Risikopatienten handelt oder sie aufgrund beruflicher Umstände einer erhöhten Ansteckungsgefahr ausgesetzt sind (wie z.B. medizinisches Personal). Der protektive Impfschutz besteht ab ca. 1-2 Wochen nach der Impfung.

2.2.1 Immunogenität der Influenzaimpfstoffe

Die Oberflächenproteine HA und NA sind die beiden Hauptantigene der Influenzaviren. Neutralisierende Antikörper, die gegen das HA gerichtet sind, können eine Influenzaerkrankung komplett unterdrücken. Die NA-spezifischen Antikörper dagegen können die virale Ausbreitung und somit die Schwere der Infektion beeinflussen [2;63;91-93]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht abschließend aufgeklärt, ob NA-spezifische Antikörper möglicherweise aufgrund einer sterischen Beeinflussung auch die eigentliche Infektion verhindern könnten. Die Bildung neutralisierender Antikörper bewirkt einen Selektionsdruck in Richtung der Entstehung neuer Driftvarianten, die sich der Erkennung durch das Immunsystem des einzelnen Individuums aber auch der sogenannten Herdenimmunität der gesamten Population entziehen können [63]. HA-spezifische Antikörper sind in der Regel gegen definierte Epitope im Bereich der globulären HA₁-Domäne gerichtet [5;94;95] und der Schutz durch die erworbene Immunität besteht nur für Folgeinfektionen mit identischen Driftvarianten. Die seltene heterosubtypische Immunität wird durch Antikörper erreicht, die gegen bestimmte nicht besonders immunogene, konserviertere Stielbereiche des HA gerichtet sind und somit einen kreuzreaktiven Schutz auch gegenüber anderen HA-Subtypen bieten [96], beispielsweise durch die sterische Hinderung der Membranfusion [97].

Um die Wirksamkeit der Influenzaimpfstoffe zu ermitteln, werden Surrogatparameter wie der Titer hämagglutinationshemmender Antikörper verwendet. Die saisonalen und die pandemischen Impfstoffe müssen derzeit für die Erstzulassung und die jährliche Stammanpassung drei durch das CHMP (*committee for medicinal products for human use*) der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) festgesetzte Kriterien zur Messung der Immunogenität erfüllen [98].

2.2.2 Influenzaimpfstoffherstellung und Erzeugung der Impfstoffsaatviren

Die Entwicklung der Influenzaimpfstoffe begann bereits in den 1940er Jahren durch das US Militär [99] und die ersten inaktivierten Influenzavirusimpfstoffe wurden erfolgreich während des 2. Weltkrieges eingesetzt. Heutzutage gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Impfstoffformulierungen; trotzdem wird der Großteil der weltweit verfügbaren saisonalen Impstoffdosen von nur sieben Herstellern abgedeckt [63;100].

Die in den Impfstoffen zu verwendenden Isolate werden durch die WHO anhand der gesammelten epidemiologischen Daten eines globalen Überwachungsnetzes festgelegt [101]. Aufgrund möglicher ungünstiger Replikationseigenschaften und den daraus resultierenden geringen Antigenausbeuten eignen sich jedoch nicht alle der zirkulierenden

Wildtypviren für die Produktion. Die Herstellung der Saatviren für die saisonalen und pandemischen Influenzaimpfstoffe erfolgt daher, indem die beiden antigenen Oberflächenproteine HA und NA des aktuellen Impfstoffkandidaten in einen Akzeptorstamm eingebracht werden. Nahezu ausschließlich wird hierfür das von der WHO empfohlene humane PR8-Isolat A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) verwendet [102], welches seit 1970 standardmäßig für die Produktion inaktivierter Impfstoffe eingesetzt wird. PR8 ist gekennzeichnet durch besonders gute Replikationseigenschaften in unterschiedlichen Vermehrungssystemen, welche in der Regel auch die mit ihm hergestellten Reassortanten auszeichnen [63;103;104].

Die derzeit erhältlichen Influenzaimpfstoffe werden vorwiegend in etwa 9-11 Tage bebrüteten embryonierten Hühnereiern produziert. Die Produktionszeit beträgt hierbei in etwa ein halbes Jahr [63], währendem die Gefahr besteht, dass der zuvor ausgewählte zirkulierende Stamm bereits durch neue Driftvarianten abgelöst wird und der produzierte Impfstoff nur noch einen partiellen Infektionsschutz bietet. Weitere Probleme bei der Herstellung im Ei-System bestehen in einer weltweit begrenzten Verfügbarkeit von Hühnereiern, einer eingeschränkten Anwendbarkeit der Impfstoffe bei Personen mit einer Hühnereiweißallergie und möglichen Kontaminationsgefahren durch Ei-Pathogene. Dieses Vermehrungssystem ist zudem aufgrund der ausgeprägten Embryoletalität für die Anzucht hochpathogener Viren ungeeignet. Neben dem Ei-Standardsystem werden daher zunehmend auch auf Zellkulturen basierende Virusanzuchtsysteme wie z.B. MDCK- und Vero-Zellen eingesetzt [105-108].

2.2.2.1 Saisonale Impfstoffe

Im Hinblick auf die sich jährlich verändernde epidemiologische Situation müssen die saisonalen Impfstoffe den jeweilig zirkulierenden Driftvarianten angepasst werden. Dieses Phänomen ist im Bereich der Impfstoffe für die Influenzaviren einzigartig und tritt bei keinem anderen viralen oder bakteriellen Impfstoff auf. Die aktuell verwendeten saisonalen Impfstoffe sind trivalent und bestehen aus zwei Influenza-A-Viren (H1N1 und H3N2) sowie einer Influenza-B-Komponente. Seit 2013 ist in Europa der erste quadrivalente Impfstoff zugelassen, der voraussichtlich ab der Impfsaison 2013/14 eingesetzt wird. Diese neue Generation an Impfstoffen enthält erstmals zwei unterschiedliche Influenza-B-Stämme [63].

Da die jährlichen Epidemien in der nördlichen Hemisphäre zwischen November bis April auftreten, liegt die Hauptimpfsaison dort im Zeitraum von Oktober bis November und in dem vorausgehenden Februar erfolgt jeweils die Bestimmung der Stammzusammensetzung durch die WHO. Aufgrund der verschobenen Jahreszeiten liegt die Grippesaison in der

südlichen Hemisphäre zwischen Mai und Oktober und die Zusammensetzung wird im September bekanntgegeben.

Saisonale Impfstoffe frischen eine bestehende Basisimmunität auf und ermöglichen eine Anpassung an neuartige Driftvarianten. Für junge bis mittelalte gesunde Erwachsene mit intaktem Immunsystem reicht daher die einmalige Verabreichung einer relativ geringen Antigendosis aus. In der Regel werden die meisten der im Hühnerei produzierten Impfstoffe auf 15 µg HA pro Influenzastamm formuliert, somit enthalten die trivalenten Impfstoffe einen Gesamtgehalt von 45 µg HA-Antigen. Um diese benötigte Antigenmenge zu produzieren kalkuliert man mit einem Ei pro Impfdosis. Die Abbildung 2-7 zeigt eine schematische Übersicht der verschiedenen ablaufenden Prozessschritten der Impfstoffproduktion.



Abbildung 2-7 Übersicht der Prozessschritte bei der Influenzaimpfstoffproduktion

Die verschiedenen Komponenten des trivalenten Impfstoffes werden zunächst separat produziert und erst bei der Herstellung des finalen Produktes vereinigt. Die Virusvermehrung kann je nach System in embryonierten Hühnereiern oder Zellkulturen stattfinden. Die Inaktivierung erfolgt durch Formaldehyd, β -Propiolacton oder UV-Strahlung und je nach Impfstoffformulierung (siehe 2.2.3) schließen sich unterschiedliche weitere Aufbereitungen der Antigenkomponenten an. Modifiziert nach [109].

2.2.2.2 Pandemische Impfstoffe

Im Vergleich zu den jährlichen Epidemien kommt es nur selten zu Pandemien mit nicht vorhersagbaren, neuartigen oder bereits seit langer Zeit nicht mehr in der Population zirkulierenden Influenzaviren. Solche pandemischen Viren besitzen neue antigene Eigenschaften. Hierbei handelt es sich vorwiegend um durch Antigen shift entstandene Reassortanten oder aber um Viren, die direkte aus dem Tier – erfahrungsgemäß aus Vögeln

oder Schweinen – auf den Menschen übertragen wurden [2;106;110]. Pandemien sind durch eine weltweite Ausbreitung mit in aller Regel hohen Mortalitätsraten gekennzeichnet. Die letzten großen Pandemien, bei denen ein neuer Subtyp in der humanen Population aufgetreten ist, ereigneten sich 1918, 1957 und 1968 (siehe Abbildung 2-8).

Im Jahr 1977 ist der zuvor nicht mehr beobachtete H1N1-Subtyp zurückgekehrt und zirkuliert seitdem gemeinsam mit dem H3N2 in der menschlichen Bevölkerung. 2009 wurde dann das humane H1N1- durch das H1N1pdm09-Virus („Schweinegrippevirus“) abgelöst. Bereits im Jahr 1997 wurden erstmals humane Infektionen mit einem hochpathogenen aviären H5N1 beobachtet [111;112]. Der Ausbruch in Asien konnte zwar durch eine systematische Massenschlachtung des Geflügelbestandes eingedämmt werden [113], jedoch sind die Viren seitdem in den domestizierten Vogelarten endemisch. Diese Voraussetzungen machen H5N1 zu einem potenziellen Pandemiekandidaten, obwohl bis jetzt nur in seltenen Fällen eine direkte Übertragung vom aviären Wirt auf den Menschen beobachtet wurde und zurzeit noch keine effektive Übertragung zwischen Menschen stattfindet [114]. Ein weiterer potenzieller Kandidat für eine Pandemie ist das ebenfalls im Geflügel endemische H9N2 [115;116], bei dem erstmals 1999 von humanen Infektionen berichtet wurde [117].

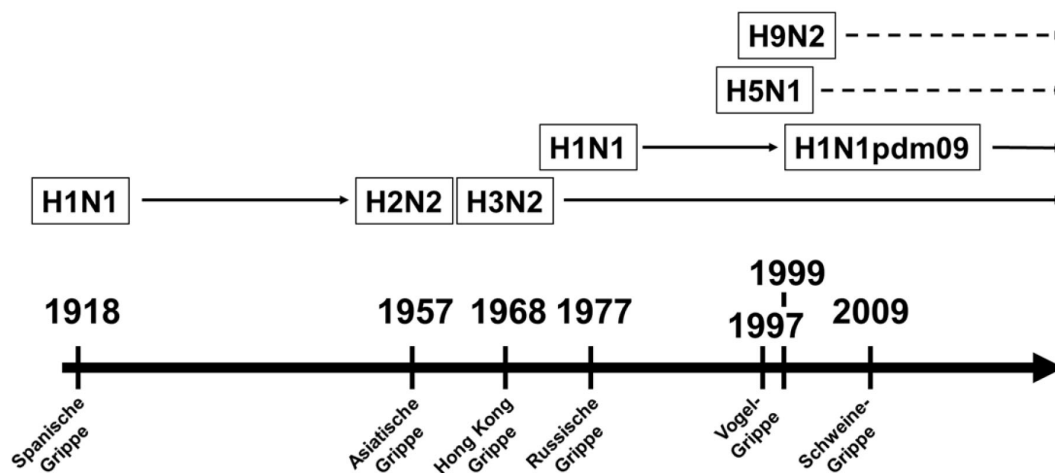


Abbildung 2-8 Zeitverlauf neuartiger Influenzasubtypen in der humanen Population

Dargestellt ist das zeitliche Auftreten unterschiedlicher Influenzasubtypen in der humanen Bevölkerung. Bei den H5N1-Viren ist es seit 1997 zu sporadisch, wiederkehrenden Infektionen im Menschen gekommen. Für das H9N2 sind erstmals 1999 und seit dem wiederholt Fälle der Übertragung dokumentiert.

Von dem ersten Auftreten und der Identifizierung des pandemischen Isolates bis zur notwendigen Verfügbarkeit eines Impfstoffes ist nur ein relativ kurzes Zeitfenster verfügbar. Die durch die saisonale Impfung vorhandenen, neutralisierenden Antikörper bieten keinen

Schutz vor einer Ansteckung mit einem neuartigen pandemischen Virus, weshalb spezifisch an den neuen Subtyp angepasste, monovalente pandemische Impfstoffe hergestellt werden müssen. Diese Impfstoffe dienen zur Grundimmunisierung einer immunologisch naiven Bevölkerung, wodurch eine wiederholte Immunisierung mit höheren, ggf. adjuvantierten Impfstoffen erforderlich ist. Durch diese Notwendigkeit verstärkt sich das ohnehin bestehende Problem, trotz begrenzter Kapazitätsmöglichkeiten eine ausreichende Impfantigenmenge zeitnah zu produzieren. Eine Möglichkeit der Vorbereitung innerhalb der interpandemischen Zeit ist die Erstellung von Virus-Bibliotheken, die aus unterschiedlichen Reassortanten bestehen. Potenzielle Saatviren können so bereits zu Beginn einer neuen Pandemie für die Produktion zur Verfügung stehen. Ein weiterer denkbarer Ansatz ist die Ergänzung der saisonalen Impfstoffe um wechselnde potenziell pandemische Antigene mit dem Ziel, eine breite Grundimmunität gegen unterschiedliche Subtypen bereits vor Eintreffen der Pandemie in der Population auszubilden und so die Problematik der notwendigen Impfstoffmengen im Pandemiefall zu umgehen [109]. Das derzeitig standardmäßig eingesetzte Anzüchtssystem im Hühnerei birgt mehrere Probleme im Zusammenhang mit einer unvorhersehbaren Produktion pandemischer Impfstoffe. Zum einen ist die weltweite Verfügbarkeit von Hühnereiern limitiert und die Produktion benötigt eine gewisse Vorlaufzeit, zum anderen besteht zusätzlich die Gefahr, dass ein neues Influenzavirus auch für die Hühner pathogen ist und in Folge der Erkrankung der Tiere die Impfstoffproduktion aufgrund der fehlenden Hühnereier zum Erliegen kommen könnte [76]. Solche Problematiken unterstützen die Notwendigkeit der Entwicklung und Herstellung von Influenzaimpfstoffen in Zellkultur.

2.2.3 Impfstoffformulierungen

Abhängig von dem Grad der Antigenaufbereitung wird zwischen unterschiedlichen Impfstoffformulierungen unterschieden (siehe Abbildung 2-9). Bei den Ganzvirusimpfstoffen existieren zwei verschiedene Anwendungsformen. Zum einen werden lebendattenuierte Viren eingesetzt, deren Erzeugung auf der Verwendung speziell veränderter Akzeptorstämme – wie der kälteadaptierten attenuierte Variante A/Ann Arbor/6/1960 ca (H2N2) – beruht [118-122]. Das entsprechende Wildtypisolat und der attenuierte Stamm unterscheiden sich durch insgesamt vier in den Polymerase-Genen 1 und 2 und dem NP-Gen liegenden Mutationen [123]. Diese bewirken, dass eine gute Replikation nur bei 25-33 °C und nicht mehr bei den im Respirationstrakt vorherrschenden höheren Temperaturen abläuft [65]. Die zugelassenen lebendattenuierten Impfstoffe werden intranasal als Spray verabreicht. Eine zweite Anwendungsform sind die chemisch behandelten und dadurch inaktivierten Ganzvirusimpfstoffe. Diese werden aufgrund ihrer

erhöhten Nebenwirkungsraten [109;124;125] seltener eingesetzt als die durch Behandlung der Viren mit Detergenzien entstehenden Spaltimpfstoffe. Die Untereinheitenimpfstoffe werden durch die zusätzliche Entfernung weiterer Komponenten (wie z.B. virale NP- und M-Proteine) generiert. Um eine bessere Antigenpräsentation dieser am stärksten aufgereinigten Impfpräparation zu erzielen, werden beispielsweise Virosome verwendet, bei denen die Proteine in Liposomen integriert vorliegen [126;127].

Im Zuge der Steigerung des Aufreinigungsgrades der Antigene nimmt die Verträglichkeit zu, die Immunogenität der Impfstoffe jedoch ab. Um diesem Phänomen entgegenzuwirken, werden immunstimulierende Adjuvanzien, wie die squalenbasierten Wirkverstärker MF59 oder AS03 zu den Impfantigenpräparationen zugegeben. Die klassischen Aluminiumhydroxid basierten Adjuvanzsysteme haben sich hingegen insgesamt als eher ungeeignet für Influenzaimpfstoffe herausgestellt [63;109;128]. Die meisten Influenzaimpfstoffe werden intramuskulär appliziert, es existieren aber auch Formulierungen, die intradermal verabreicht werden [129].

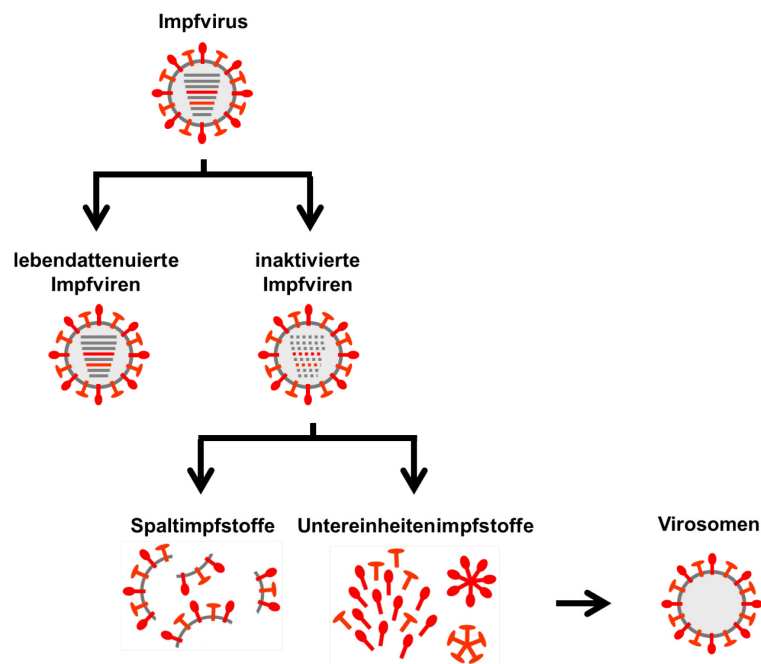


Abbildung 2-9 Übersicht unterschiedlicher Influenza Impfstoffformulierungen

Darstellung einer schematischen Übersicht der unterschiedlichen Impfstoffformulierungen. Ganzvirusimpfstoffe können in Form der lebendattenuierten Variante oder als chemisch inaktivierte Form eingesetzt werden. Eine weitere Aufreinigung der Impfantigene resultiert in den Spalt- und den Untereinheitenimpfstoffen, die für eine bessere Antigenpräsentation auch als Virosomen eingesetzt werden. Modifiziert nach [130]

2.2.4 Neuartige alternative Influenzaimpfstoffansätze

Neben den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen klassischen Influenzaimpfstoffen existieren verschiedene Ansätze zur Entwicklung neuartiger Produkte. Ein Ansatz ist die Verwendung alternativer Produktionssysteme wie die Nutzung des Baculoexpressionssystems zur rekombinanten Herstellung des HA-Proteins in *Spodoptera frugiperda* Sf9 Insektenzellen. Hierbei wurden Expressionskassetten verwendet, die neben dem HA auch noch das NA und das M1 kodieren. Die Anwesenheit des M1 bewirkt eine spontane Bildung von VLPs (*virus-like particles*) [131;132]. VLPs sind Viruspartikel, die keine Nukleinsäuren enthalten dadurch nicht replikationsfähig sind und sich somit optimal als Antigenpräsentationssysteme eignen. Andere Ansätze verfolgen alternative Präsentationssysteme, bei denen beispielsweise das HA an das bakterielle Flagellin als Immunstimulator gekoppelt wird [133] oder Viren wie das MVA (*modified vaccina Ankara*) [134], das Newcastle-Disease-Virus [135] oder Adenoviren [136] als Vektoren zum Einsatz kommen. Zusätzlich wurden auch andersartige Impfstoffklassen wie DNA-basierte Impfstoffe auf ihre Verwendbarkeit zur Immunisierung gegen Influenzaviren untersucht [137].

Ein großes Fernziel wäre die Entwicklung eines universellen Influenzaimpfstoffes, der die jährliche Anpassung an Driftvarianten überflüssig machen und einen Schutz für unterschiedliche Subtypen bieten könnte. Hierfür wurden bereits viele unterschiedliche Ansätze verfolgt, darunter die Verwendung der 23 AS langen Ektodomäne des M2-Proteins (M2e), die auf der Virusoberseite lokalisiert ist [138;139] und u.a. an das spontan immunogene VLPs bildende Hepatitis-B core Antigen fusioniert wurde [140;141]. Andere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Verwendung alternativer, weniger variabler Epitope der Stielregionen des HA [142] oder kombinierten direkt mehrere konservierte, lineare Epitope in einem rekombinanten Protein [143;144].

2.3 Zielsetzung

Das H1N1-Virus A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) wird in der Impfstoffproduktion seit den 70er Jahren des 19. Jahrhunderts standardmäßig als Akzeptorstamm zur Reassortierung der zirkulierenden epidemischen Influenzaviren für die Herstellung der Saatviren verwendet [63;102]. Hierbei handelt es sich um ein gut charakterisiertes humanes H1N1-Isolat, das zu hohen Titern in verschiedenen Proliferationssystemen wie embryonierten Hühnereiern [145] und unterschiedlichen Zelllinien repliziert. In aller Regel zeichnen sich auch die mit dem PR8 gebildeten Reassortanten – ebenso wie der Akzeptorstamm PR8 – durch eine hohe Antigenausbeute in verschiedenen Vermehrungssystemen aus [102-104].

Es konnte in der Vergangenheit sowohl bei der Generierung der Impfstoffsaatviren mit saisonalen als auch bei neuen pandemischen Isolaten beobachtet werden, dass nicht alle zirkulierenden Viren nach Reassortierung mit PR8 die gewünschten Antigenausbeuten erbrachten. Speziell im Falle einer Pandemie ist es jedoch notwendig, dass die Antigenproduktion schnell und ertragreich ist, um zum einen zeitnah eine ausreichende Impfstoffversorgung für die Bevölkerung sicherzustellen und zum anderen wirtschaftlich rentabel zu sein. Pandemien werden durch neue Subtypen, die erstmals in der humanen Population auftreten und häufig einen aviären Ursprung aufweisen, ausgelöst. Eine Ursache für eine eingeschränkte Replikation der Impfsaatvirus-Reassortanten und der damit verminderten Ausbeute könnte in einer suboptimalen Kompatibilität der Gene für die Oberflächenproteine der zirkulierenden Viren mit den internen Genen des humanen PR8 liegen. Vor diesem Hintergrund könnte sich das Einsetzen eines aviären anstelle eines humanen Hintergrundstammes für die Produktion der Saatviren positiv auf die Replikationseffizienz und die Antigenausbeute auswirken. A/Huhn/Rostock/1934 (FPV) ist ein aviäres H7N1-Isolat, das ebenso wie das PR8-Isolat in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts isoliert wurde. Somit handelt es sich bei beiden Viren um alte Laborstämme, die eine jahrzehntelange Passage-Historie sowohl in Hühnereiern als auch in unterschiedlichen Zelllinien aufweisen und gleichermaßen zu hohen Titern in diesen Vermehrungssystemen replizieren. Im Gegensatz zum niedrigpathogenen PR8 leitet sich die attenuierte Variante FPVmut von einem klassisch hochpathogenen Influenzavirus ab.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die möglichen Vorteile des aviären FPVmut als alternativer Akzeptorstamm gegenüber dem Standardstamm PR8 zur Erzeugung von Impfstoff-Saatviren untersucht werden. Zur Charakterisierung der Eignung der beiden Hintergrundstämme zur Impfstoffproduktion soll mit dem Reversen-Genetik-System ein Set an Reassortanten unterschiedlicher Virussubtypen erzeugt werden. Hierfür sollen die beiden Gene für die antigenen Oberflächenproteine HA und NA aus einem pandemischen H1N1pdm09-Isolat, aus einem potenziell pandemischen H5N1- und einem H9N2-Isolat sowie je einem humanen, saisonalen H1N1- und H3N2-Vakzinestamm in die beiden Akzeptorstämme eingebracht werden. Die Antigenausbeuten der Reassortanten sollen anschließend in dem bei der Impfstoffproduktion zur Vermehrung der Viren eingesetzten Hühnerei-System sowie den beiden Zelllinien Vero und MDCK eingehend charakterisiert werden.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit liegt in der Untersuchung der Auswirkung des viralen Matrixproteins (M) auf die Antigenausbeute. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen dem M1 und den cytoplasmatischen Bereichen von HA und NA und dessen Rolle in der

Morphogenese könnte sich ein zu den Oberflächenproteinen homologes M1 positiv auf die Integration der Proteine in die Virionen auswirken. Diese zweite Fragestellung soll anhand der Untersuchung von Reassortanten geklärt werden, die neben den beiden Oberflächenproteinen zusätzlich die korrespondierenden M-Proteine der genannten Influenzaisolate in den beiden zu vergleichenden Hintergrundstämmen besitzen.

Somit zielen also beide experimentellen Ansätze auf die Identifikation optimierter genetischer Konstellationen für die Impfstoffsaatviren ab.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller bzw. Lieferant
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad Laboratories GmbH, München
Bacto-Agar	Difco, Detroit/USA
Betaisodona	Munidpharma GmbH, Limburg
30 %-ige BSA Lösung	PAA, Pasching/Österreich
Complete (Proteaseinhibitoren)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Destilliertes Wasser (für Zellkultur)	Invitrogen, Carlsbad/USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
6x DNA Probenpuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DMEM	Biochrom, Berlin bzw. Lonza, Verviers/Belgien
Fetuin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
200 mM L-Glutamin	Biochrom, Berlin
1M 4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazinethansulfonsäure (Hepes)	Invitrogen, Carlsbad/USA
Lipofectamin2000	Invitrogen, Carlsbad/USA
MEM	Biochrom, Berlin bzw. Lonza, Verviers/Belgien
10x MEM	Invitrogen, Carlsbad/USA
7,5 %-ige Natrium-Bicarbonat Lösung	Invitrogen, Carlsbad/USA
OptiMEM I mit Glutamax	Invitrogen, Carlsbad/USA
Penicillin (5.000 U/ml)/Streptomycin (5.000 µg/ml) Lösung	Invitrogen, Carlsbad/USA
Ponal Express	Henkel, Düsseldorf
RPMI	Biochrom, Berlin
0,05 % Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad/USA

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und BioRad Laboratories (München).

3.2 Kits

Verwendung	Produkt	Hersteller bzw. Lieferant
DNA Elution aus Agarosegelen	QIAquick Gel Extraction	Qiagen GmbH, Hilden
DNA-Plasmidpräparation	<ul style="list-style-type: none"> QIAprep Spin Miniprep Kit HiSpeed Plasmid Maxi Kit 	Qiagen GmbH, Hilden
Mykoplasmenüberprüfung	Mycoplasma Detection Kit	Roche GmbH, Mannheim

Material

Verwendung	Produkt	Hersteller bzw. Lieferant
Nukleinsäure Amplifikation	<ul style="list-style-type: none"> OneStep RT-PCR Kit Expand High Fidelity PCR System First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> Qiagen GmbH, Hilden Roche GmbH, Mannheim Roche GmbH, Mannheim
Präparation kompetenter Bakterienzellen	Z-kompetent E.coli Transformations Puffer Set	Zymo Research Cooperation, Irvine/USA
Proteinbestimmung	<ul style="list-style-type: none"> Pierce BCA Protein Assay Kit Novex Colloidal Blue Staining Kit Silver Staining Kit 	<ul style="list-style-type: none"> ThermoScientific, Rockford Invitrogen, Carlsbad/USA GE Healthcare, Uppsala
RNA-Isolation	High Pure RNA Isolation Kit	Roche GmbH, Mannheim

3.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller bzw. Lieferant
Filterspitzen für Pipetten	Nerbe plus GmbH, Winsen
Kanülen Sterican (0,8 x 22 mm)	B. Braun AG, Melsungen
Mikrotiterplatten (96-well, U-förmig)	Nunc A/S, Roskilde/Dänemark
Pasteur Pipetten (steril)	VWR International GmbH, Darmstadt
Protran Nitrocellulose Transfer Membran BA85	Whatman GmbH, Dassel
Reaktionsgefäße:	
<ul style="list-style-type: none"> PCR (0,2 ml) PCR 8er Streifen (0,2 ml) Safe lock (1,5 und 2 ml) 	<ul style="list-style-type: none"> Axygen Inc., Union City/USA Biozym Scientific GmbH, Oldendorf Eppendorf AG, Hamburg
SPF Hühnereier	Valo BioMedia, Osterholz-Scharmbeck
Spritzen Omnifix-F (1 ml)	Braun, Melsungen
Zentrifugen Filter-Einheiten:	Millipore, Cork/Irland
<ul style="list-style-type: none"> Amicon Ultra-4 (100 kDa) Amicon Ultra-15 (100 kDa) 	
Zentrifugenröhrchen:	Beckman Coulter Inc., Palo Alto/USA
<ul style="list-style-type: none"> Ultraclear (11 x 34 mm) Ultraclear (14 x 89 mm) 	

Alle Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von der Firma Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen) bezogen.

3.4 Geräte und Software

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller bzw. Lieferant
Absaugsystem	Vacusaft comfort	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Elektrophorese-Systeme und Zubehör	SDS-Page: <ul style="list-style-type: none"> • Mini-Protean Tetrasystem • Mini Trans-Blot Elektrophorese Transfersystem Agarose: <ul style="list-style-type: none"> • Mini Sub Cell GT • Wide Mini Sub Cell GT 	BioRad Laboratories GmbH, München
Inkubatoren	<ul style="list-style-type: none"> • Brutgerät BSS 420 • CO₂-Inkubator C200 • Innova 40 Inkubator 	<ul style="list-style-type: none"> • Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar • Labotect GmbH, Göttingen • New Brunswick Scientific, Edison/USA
Kühleinheit	Cryo-Einfriergerät	Nalgene Nunc International, Penfield/USA
Kühlgeräte	<ul style="list-style-type: none"> • -85 °C Ultra Low Freezer • GS 3084-11B • KS 2630 	<ul style="list-style-type: none"> • New Brunswick Scientific, Enfield/USA • Liebherr, Bulle/Schweiz • Liebherr, Bulle/Schweiz
Mikroskope	<ul style="list-style-type: none"> • Wilovert 30 • EM 109 	<ul style="list-style-type: none"> • Helmut Hund GmbH, Wetzlar • Carl Zeiss AG, Oberkochen
PCR-Gerät	Primus 25 advanced PCR Cycler	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Photometer	<ul style="list-style-type: none"> • Ultraspec 1100pro • ND-1000 Nanodrop Spectrophotometer • Rainbow 	<ul style="list-style-type: none"> • Amersham Biosciences/Biochrom, Chambridge/UK • PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen • Tecan GmbH, Crailsheim
Pipetten	Einkanalpipetten: <ul style="list-style-type: none"> • Reference Mehrkanalpipetten: <ul style="list-style-type: none"> • Research pro/research plus/xplorer 	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Schüttel- und Mischgeräte	<ul style="list-style-type: none"> • Plattform Rotierer PS 3D • IKA HS 260 und MS3 basic • Vortex VF2 • Thermomixer comfort • OLS200 	<ul style="list-style-type: none"> • Grant Instruments Ltd, Cambridge/UK • Janke und Kunkel IKA Labortechnik, Staufen • Janke und Kunkel IKA Labortechnik, Staufen • Eppendorf AG, Hamburg • Grant Instruments Ltd, Cambridge/UK

Material

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller bzw. Lieferant
Sicherheitswerkbank	Heraeus LaminAir HLB 2472 GS	Thermo Electron Cooperation, Waltham/USA
Spannungsnetzgerät	Power Pack P25 T	Biometra GmbH, Göttingen
Visualisierungs-, Scan- und Drucksysteme	<ul style="list-style-type: none"> • Intas Gel Imager System • Odyssey Infrared Imaging System • HP Scanjet 4800 serie Photo scanner • Digital Monochrom Printer 	<ul style="list-style-type: none"> • Intas Science Imaging Instruments, Göttingen • Licor Bioscience GmbH, Bad Homburg • Hewlett-Packard, Palo Alto/USA • Mitsubishi Electric, Tokio/Japan
Zentrifugen:	Ultrazentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> • Optima L-80xp Rotoren: SW41Ti (r = 110,2 mm) SW60Ti (r = 91,7 mm) • Optima TL-100 Rotor: TLS55 (r = 59,4 mm) Standzentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> • Heraeus Fresco 17 Rotor: 75003424 (r = 86 mm) • Biofuge Fresco Rotor: 3325 (r = 85 mm) • Heraeus Multifuge 1 S-R Rotor: 75002000 (r = 187 mm) • Galaxy Mini 	<ul style="list-style-type: none"> • Beckman Coulter, Krefeld • Beckman Coulter, Krefeld • Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA • Heraeusinstruments, Hanau • Thermo Electron Cooperation, Waltham/USA • VWR International GmbH, Darmstadt

In dem nachfolgenden Methodenteil wurden alle Angaben zu Zentrifugationsschritten in der gebräuchlichen Einheit Umdrehungen pro Minute (rpm) angegeben. Die relative Zentrifugalkraft (RCF) basiert auf der Erdbeschleunigung (g) und ist folglich Zentrifugen unabhängig. Beide Angaben lassen sich ineinander umrechnen:

$$RCF = 1,12 \times r \times (rpm/1000)^2$$

r = Rotorradius [mm]

Software	Hersteller bzw. Lieferant
Combistats Version 4.0	EDQM
Excel 2010	Microsoft Corporation
Version 14.0.6129.5000	
GraphPad Prism Version 5.04	GraphPad Software Inc.
IntasGelCaptureEntry Datei	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Version 1.0.2481.14009	
Metric Version 8.04	SLTec GmbH, Itzehoe
Odyssey Infrared Imaging System	Licor Bioscience GmbH, Bad Homburg
Application Software Version 2.1	

Software	Hersteller bzw. Lieferant
Adobe Photoshop CS6 Version 13.0.1	Adobe System Incorporated
VectorNTI Version 9.0	Invitrogen, Carlsbad/USA

3.5 Enzyme

Enzym	Hersteller bzw. Lieferant
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase (5 U/μl) bzw. HC (30 U/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Calf intestine Alkalische Phosphatase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TPCK-Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Taq Polymerase (5.000 U/ml)	New England BioLabs, Frankfurt am Main
<i>Vibrio cholerae</i> Neuraminidase (1,61 U/ml)	Fluka, Steinheim

3.6 Antikörper und Antigene

3.6.1 Primäre Antiseren

Antiseren	Spezies	Verwendung und Verdünnung	Hersteller
Anti-H1 (A/Solomon Islands/3/2006) Prod.-Nr. 07/104	Schaf	SRID 5μl/ml WB 1/10.000	NIBSC, UK
Anti-H9 (A/Chick/Hong Kong/G9/1997) Prod.-Nr. 08/202	Schaf	SRID bei AF: 10μl/ml SRID bei ZK: 5μl/ml WB 1/10.000	NIBSC, UK
Anti-H3 (A/Wisconsin/67/2005) Prod.-Nr. 05/236	Schaf	SRID 9,8μl/ml WB 1/10.000	NIBSC, UK
Anti-H5 (A/Vietnam/1194/04) Prod.-Nr. 04/214	Schaf	SRID 10μl/ml WB 1/10.000	NIBSC, UK
Anti-H1pdm09 (A/California/7/2009) Prod.-Nr. 10/118	Schaf	SRID 7,6μl/ml WB 1/10.000	NIBSC, UK
Anti-NP Prod.-Nr. I7649-40N	Kaninchen	WB 1/1.000	USBiological über Biomol, Hamburg

3.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verwendung und Verdünnung	Hersteller
Anti-Schaf IRDye800CW	Esel	WB 1/10.000	Rockland, Gilbertsville/USA
Anti-Schaf IRDye700DX	Esel	WB 1/10.000	Rockland, Gilbertsville/USA
Anti-Kaninchen IRDye700DX	Esel	WB 1/5.000	Rockland, Gilbertsville/USA
Anti-Kaninchen IRDye800CW	Esel	WB 1/10.000	Rockland, Gilbertsville/USA

3.6.3 Antigene

Antigen	Subtyp	Gehalt	Verwendung	Hersteller
A/Solomon Islands/3/2006 Prod.-Nr. 07/102	H1N1	15µg/ml	SRID	NIBSC, UK
A/California/7/09 (NIBRG-121xp) Prod.-Nr. 09/196	H1N1pdm09	18,5µg/ml	SRID	NIBSC, UK
A/Wisconsin/67/2005 Prod.-Nr. 06/106	H3N2	22,5µg/ml	SRID	NIBSC, UK
A/Vietnam/1194/2004 Prod.-Nr. 09/184	H5N1	22,3µg/ml	SRID	NIBSC, UK
A/Chick/Hong Kong/G9/1997 Prod.-Nr. 08/228	H9N2	25µg/ml	SRID	NIBSC, UK

3.7 Längenstandards

Alle verwendeten Längenstandards wurden als *ready to use* Formulierungen der Firma Fermentas aus St. Leon-Rot bezogen.

Für Agarosegele:	Für SDS-PAGE Gele:
<ul style="list-style-type: none"> GeneRuler Low Range DNA Ladder GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 	<ul style="list-style-type: none"> PageRuler Plus Prestained Protein Ladder

3.8 Oligonukleotid-Primer

Alle Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon aus Ebersberg synthetisiert. Die Konzentration zur Lagerung bei -20 °C betrug 100 µM in Tris-HCl pH 8,5. Für die Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie für die Sequenzierung wurden Arbeitslösungen von 10 µM angesetzt. Eine exakte Auflistung aller Primer, deren Bezeichnung, Verwendung und Sequenz befindet sich im Anhang (siehe 8.1).

3.9 Vektoren

Vektor	Sequenzelemente	Verwendung	Virusisolat	Referenz
pHH21	<ul style="list-style-type: none"> humaner RNA-Pol I Promotor muriner RNA-Pol I Terminator 	Virus rescue (vRNA)	FPVmut	Neumann <i>et al.</i> [77]
pPollSapIT	<ul style="list-style-type: none"> humaner RNA-Pol I Promotor murine rDNA Terminator 	Virus rescue (vRNA)	PR8	Subbarao <i>et al.</i> [146]

Vektor	Sequenzelemente	Verwendung	Virusisolat	Referenz
pHW2000	<ul style="list-style-type: none"> • humaner RNA-Pol I Promotor • muriner RNA-Pol I Terminator • CMV Promotor • Poly-A-Signal 	Virus rescue (vRNA + mRNA)	diverse Isolate	Hoffmann <i>et al.</i> [79]
pcDNA3	<ul style="list-style-type: none"> • CMV Promotor • BGH Poly-A-Signal 	Expressions-plasmide (mRNA)	PR8	Invitrogen, Carlsbad/USA

Eine exakte Auflistung im Rahmen dieser Arbeit klonierten sowie weiteren Plasmide befindet sich im Anhang (siehe 8.2). Alle Vektoren tragen als Selektionsmarker das Resistenzgen für Ampicillin.

3.10 Virusisolate

Subtyp	Isolat*
H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 = PR8 Akzeptorstamm
H1N1	A/Solomon Islands/3/2006 Vakzinestamm nördliche Hemisphäre Saison 07/08
H1N1pdm09	A/California/07/2009 und A/Hamburg/05/2009
H3N2	A/Wisconsin/67/2005 Vakzinestamm nördliche Hemisphäre Saison 06/07 und 07/08
H5N1	Attenuierte Variante des A/Vietnam/1194/2004
H7N1	Attenuierte Variante des A/Huhn/FPV/Rostock/1934 =FPVmut Akzeptorstamm
H9N2	A/Huhn/Beijing/2/1997

* ergänzende Sequenzinformation siehe 8.3

Lagerung der Viren bei -80 °C.

3.11 Organismen

3.11.1 Zelllinien

Zelllinien	Herkunft	Spezies	Kulturmedium
293T	embryonale Nierenepithelzellen	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	DMEM
A549	Lungencarcinomaepithelzellen	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	RPMI
MDCK II	Nierenepithelzellen	<i>Canis familiaris</i> (Hund)	MEM bzw. DMEM
Vero76	Nierenepithelzellen	<i>Cercopithecus aethiops</i> (grüne Meerkatze)	DMEM

Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhären wachsende Zellen, die im flüssigen Stockstoff gelagert wurden.

3.11.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Selektionsmarker	Lieferant
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tetr)].	Tetrazyklin [10 µg/ml]	Stratagene/Agilent Technologies Inc., Santa Clara/USA
SURE 2	e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC:Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Tetrazyklin [10 µg/ml] Kanamycin [30 µg/ml] Chloramphenicol [60 µg/ml]	Stratagene/Agilent Technologies Inc., Santa Clara/USA

3.12 Kulturmedien

3.12.1 Medien für Zelllinien

3.12.1.1 Kulturmedien

Je nach Zelllinie (siehe 3.11.1) wurden folgende Medien verwendet: Dulbecco's modifizierten Eagle Medium mit 4,5 g Glucose/Liter (DMEM), Eagle's Minimum Essentiales Medium (MEM) oder Roswell Park Memorial Insitut Medium (RPMI). Diese wurden entsprechend komplementiert:

1x	Medium
10 % (v/v)	FKS
1 % (v/v)	L-Glutamin (200mM)
1 % (v/v)	Pen/Strep (5.000 U/ml und 5.000 µg/ml)

Das verwendete fötale Kälberserum (FKS) wurde zuvor für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

3.12.1.2 Medien für Infektionsversuche

Das TPCK-Trypsin wurde in PBS⁺⁺ gelöst.

1x DMEM^{Inf}/MEM^{Inf} bzw. RPMI^{Inf}, für Zellinfektion

1x	Medium
0,2 % (v/v)	BSA (30 %)
1 % (v/v)	L-Glutamin (200mM)
1 % (v/v)	Pen/Strep (5.000 U/ml und 5.000 µg/ml)
0,25-1 µg/ml	TPCK-Trypsin (1 mg/ml)

Material

MEM^{OV}, Agar-Overlay für Plaque-Assay

bei 37 °C:	2x	MEM (10x)
	0,45 % (v/v)	Natrium-Bicarbonat (7,5 %)
	2 % (v/v)	L-Glutamin (200mM)
	1,2 % (v/v)	BSA (30 %)
	1 µg/ml	TPCK-Trypsin (1 mg/ml)
	ad	dH ₂ O
bei 56 °C:	1,8 % (w/v)	Bacto-Agar bzw. Agarose gelöst in H ₂ O

Direkt vor der Verwendung beide Ansätze 1+1 zusammengeben.

3.12.2 Medien und Zusätze für Bakterien

LB-Medium (pH 7,5)	10g	Pepton aus Casein
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	ad 1 l	dH ₂ O

SOB-Medium (pH 7,0)	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,95 g	Magnesiumchlorid
	0,5 g	Natriumchlorid
	0,186 g	Kaliumchlorid
	ad 1 l	dH ₂ O

Die Medien wurden mittels Autoklavieren sterilisiert (120 °C +/- 2 °C, Zeit 15min +/- 1min). Vor Verwendung wurden sie entsprechend der anzuziehenden Bakterienstämme mit Antibiotika komplementiert. Bei XL1-Blue mit 10 µg/ml Tetrazyklin (10-12,5 mg/ml in Ethanol), bei SURE 2 zusätzlich mit 30 µg/ml Kanamycin (30 mg/ml in H₂O) und 60 µg/ml Chloramphenicol (6 mg/ml in Ethanol). Zur Selektion transformierter Bakterien wurde 100 µg/ml Ampicillin (20 mg/ml in H₂O) verwendet.

LB-Amp-Agar	1,5-4 %	Bacto-Agar in LB-Medium
-------------	---------	-------------------------

Nach dem Autoklavieren muss das Medium auf 40 °C abkühlen, bevor 100-200 mg/l Ampicillin (20 mg/ml in H₂O) zugegeben werden können.

3.13 Puffer und Lösungen

Agarose für SRID	1 % (w/v) Agarose Type II in PBS ^{SRID}
------------------	--

Material		
Alsever-Lösung	2,050 g 0,8 g 0,42 g 0,055 g ad 100 ml pH 6,1	Glucose Natriumcitrat Natriumchlorid Zitronensäure dH ₂ O
Arsenit Lösung	10 g 7,1 g ad 100 ml 0,3 ml	Natrium-meta Arsenit Natriumsulfat dH ₂ O Schwefelsäure Lagerung RT
Blockingpuffer	5 % (w/v)	Albumin Fraktion V in PBS-T
DTT	20 mM	DTT in dH ₂ O frisch anzusetzen
Fetuin	25 mg/ml	Fetuin in PBS ⁺⁺ Lagerung -20 °C
Kristallviolett-Lösung	10 % (v/v) 0,1 % (w/v)	37 % Formaldehydlösung Kristallviolett in dH ₂ O
NaCl-Lösung	8,5 g ad 1 l	Natriumchlorid dH ₂ O
Paraformaldehyd	8 % (w/v)	Formaldehyd in PBS ^{def} zum Lösen Erwärmen (<70 °C) Endkonzentration bei Inaktivierung 2%
PBS ⁺⁺	0,9 mM 0,5 mM 2,67 mM 1,47 mM 137,93 mM 8,06 mM	Calciumchlorid Magnesiumchlorid Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Natriumchlorid di-Natriumhydrogenphosphat
Dieser Puffer wurde kommerziell von Life Technologies/GIBCO erworben.		
PBS ⁺⁺ /0,1 % BSA	0,1 % (w/v)	Albumin Fraktion V in PBS ⁺⁺ Lagerung 4°C
PBS ⁺⁺ /0,2 % BSA	0,2 % (v/v)	BSA-Lösung (30 %) in PBS ⁺⁺ Lagerung 4°C

Material

PBS ^{def} /PBS ^{Zell}	8 g	Natriumchlorid
	0,2 g	Kaliumchlorid
	0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	1,15 g	di-Natriumhydrogenphosphat
	ad 1 l	dH ₂ O
	pH 7,2	1 N HCl
Für die Zellkultur wurde kommerziell erhältliches PBS der Firmen Biochrom (Berlin) bzw. Lonza (Verviers/Belgien) verwendet. Die Zusammensetzung entspricht der des PBS ^{def} .		
PBS ^{HA}	21,25 g	Natriumchlorid
	1,74 g	di-Natriumhydrogenphosphat
	0,79 g	Natriumdihydrogenphosphat
	ad 2,5 l	dH ₂ O
	pH 7,2	1 N HCl
PBS ^{SRID}	10 g	Natriumchlorid
	0,25 g	Kaliumchlorid
	0,25 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	1,44 g	di-Natriumhydrogenphosphat
	ad 1 l	dH ₂ O
	pH 7,4	1 N HCl
PBS-T	0,1 % (v/v)	Tween20 in PBS ^{def}
Perjodat	4,28 g	Natrium-meta-Perjodat
	32 ml	dH ₂ O
	62 ml	Phosphorsäure
		Lagerung bei RT unter Lichtausschluss
6x Proteingel-Probenpuffer (nicht reduzierend)	1,5 g	SDS
	4,5 ml	Glycerol
	5 ml	1M Tris (pH 6,8)
	10 mg	Bromphenolblau
	ad 15 ml	dH ₂ O
5 %-iges Sammelgel	1,3 ml	30 % Acrylamid Mix Rotiphorese (37,5:1)
	1 ml	1 M Tris (pH 6,8)
	0,08 ml	10 % SDS-Lösung
	5,5 ml	dH ₂ O
vor Verwendung	0,08 ml	10 % APS-Lösung
	0,008 ml	TEMED
		30 min Polymerisation

Material		
10x SDS Laufpuffer	30,299 g 144,21 g 10 g ad 1 l	Tris Glycin SDS dH ₂ O
SRID-Entfärbelösung	200 ml 1000 ml 1000 ml	Essigsäure Methanol dH ₂ O
SRID-Färbelösung	0,3 % (w/v)	Coomassie-Brilliant Blau R-250 in SRID-Entfärbelösung
Sucroselösung	30 bzw. 60 % (w/w)	Sucrose in PBS ^{def}
20x TAE	96,8 g 22,84 ml 40 ml ad 1 l	Tris Eisessig 0,5 M EDTA (pH 8,0) dH ₂ O
2-TBA	0,3 g 3,55 g ad 50 ml	2-TBA Natriumsulfat dH ₂ O zum Lösen leicht erwärmen, Lagerung RT, 1 Woche haltbar
TPCK-Trypsin	50 mg 50 ml	TPCK-Trypsin PBS ⁺⁺ Arbeitskonzentration 0,5-1 µg/ml
Transferpuffer	1x 200 ml ad 1 l	Western-Salts (10x) Methanol d H ₂ O
10 %-iges Trenngel	6,7 ml 5 ml 0,2 ml 7,6 ml	30 % Acrylamid Mix Rotiphorese (37,5:1) 1,5 M Tris (pH 8,8) 10 % SDS-Lösung dH ₂ O
vor Verwendung	0,2 ml 0,008 ml	10 % APS-Lösung TEMED mit Isopropanol überschichten, 30 min Polymerisation
Trypanblau-Färbelösung	0,4 % (w/v)	Trypanblau (40 % Farbstoff) in Natriumchlorid-Lösung (0,85 %)

Material		
10x Western-Salts	530,29 g 142,63 g 0,2 g ad 1 l pH 8,3	Tris Glycin SDS dH ₂ O 1 M Salzsäure
Warrenoff Reagenz	5 ml 100 ml	konzentrierte Salzsäure Butanol Lagerung RT
Zwittergent	10 % (w/v)	3-(N,N-Dimethylmyristylammino)propanesulfonate in dH ₂ O

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

Alle verwendeten Bakterien sind Derivate des *E. coli* K12 Sicherheitsstammes.

4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Transformationskompetente XL1-blue bzw. SURE2 Bakterien (siehe 3.11.2) wurden mittels des Kits zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen der Firma ZymoResearch (siehe 3.2) erzeugt. Hierfür wurde eine 5 ml LB-Medium Übernacht-Vorkultur im Innova 40 Inkubator bei 37 °C schüttelnd angezogen, woraus 100 bzw. 500 µl zur Inokulation von 100 ml SOB-Medium verwendet wurden. Beide Medien wurden für die Selektion mit den entsprechenden Antibiotika (siehe 3.11.2) komplementiert. Das Wachstum der Bakterien erfolgte schüttelnd bei 25 °C bis zu einer maximalen OD₆₀₀ zwischen 0,4-0,6 (Ultraspec 1100pro Photometer). Die Bakterien wurden entsprechend der Herstellerangaben chemisch kompetent gemacht, anschließend im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Überprüfung der Kompetenz erfolgte anhand der Transformation (siehe 4.1.2) eines zirkulären Kontrollplasmids.

4.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente Bakterien (siehe 4.1.1) sind in der Lage fremde DNA aufzunehmen. Der Selektionsmarker zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation befindet sich auf dem einzubringenden Plasmid, in dieser Arbeit wurde ausschließlich das Resistenzgen gegen Ampicillin verwendet. 100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1-5 µl des Ligationsansatzes (siehe 4.3.5.2) hinzugegeben. Für eine Retransformation bereits aus *E. coli* isolierter Plasmide wurde nur 0,5-1 µl zirkuläre DNA eingesetzt. Nach einer Inkubation von 0,5-1 h auf Eis wurden die Bakterien auf vorgewärmten LB-Amp-Agarplatten (siehe 3.12.2) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C im Innova 40 Inkubator angezogen. Zur Überprüfung der antibiotikumhaltigen Agarplatten wurden parallel nicht transformierte Bakterien ausgestrichen.

4.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit den eukaryotischen Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Heraeus LaminAir HLB 2472 GS Sicherheitswerkbank.

4.2.1 Kultivierung von MDCK II-, 293T-, Vero- und A549-Zellen

Die Kultivierung der permanenten, adhärennten Zelllinien (siehe 3.11.1) erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % Luftfeuchtigkeit in Cellstar Filter-Zellkulturflaschen der Firma Greiner Bio-One im CO₂-Inkubator C200. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen umgesetzt, wobei alle verwendeten Reagenzien vor Benutzung auf 37 °C erwärmt wurden. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS^{Zell} (siehe 3.13) pro 75 cm² Wachstumsfläche, die MDCK II-Zellen zusätzlich mit 5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA, gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte in 1,5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA pro 75 cm² Wachstumsfläche bei Vero und MDCK II bei 37 °C, bzw. für die übrigen Zelllinien bei RT. Sobald die Zellen gelöst waren, wurden sie in 10 ml Kulturmedium (siehe 3.12) suspendiert und entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit in eine neue Zellkulturflasche vorgelegt, wobei pro 75 cm² Wachstumsfläche 15 ml frisches Medium zugegeben wurde.

Für die verschiedenen Infektionsexperimente (siehe 4.5.1, 4.5.2.2 und 4.5.4) wurde eine feste Zellzahl vorgelegt (siehe Tabelle 2). Diese wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, wobei durch Multiplikation der über einem Großquadrat ausgezählten Zellen mit dem Kammerfaktor 10⁴ die Zellzahl pro ml Zellsuspension erhalten wurde. Der Faktor errechnet sich hierbei durch das ausgewertete Volumen über einem Großquadrat (1 mm x 1 mm x 0,1 mm = 0,1 mm³ entspricht 0,1 µl) bezogen auf 1 ml.

Die Vitalität der verwendeten Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung überprüft indem die zu zählende Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Färbelösung (siehe 3.13) gemischt und 2 min inkubiert wurde. Die lebenden Zellen bleiben dabei ungefärbt und die abgestorbenen Zellen zeichnen sich durch eine Färbung aufgrund des eindiffundierten blauen Farbstoffes aus.

Tabelle 2: Zellzahlen/Wachstumsfläche für Infektionsexperimente

Wachstumsfläche [cm ²]	Zelllinie	Zellzahl [gesamt]	Volumen [ml]	Verwendung
9,6	MDCK II	$0,7-1 \times 10^6$	2	Plaque-Assay
21	MDCK II	$1,4-1,8 \times 10^6$	4	Virusrescue
	293T	$2-3 \times 10^6$	2,5	Virusrescue
25	MDCK II	$3-4 \times 10^6$	5	Zellinfektion
	Vero	$7,5-9 \times 10^5$	5	Zellinfektion
	A549	$7-8 \times 10^5$	5	Zellinfektion
75	MDCK II	1×10^7	15	Zellinfektion
	Vero	3×10^6	15	Zellinfektion
	A549	4×10^6	15	Zellinfektion
175	MDCK II	$2-3 \times 10^7$	35	Zellinfektion
	Vero	7×10^7	35	Zellinfektion

4.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien zur Lagerung

Zur permanenten Vorratslagerung können Zellen bei -80 °C gelagert und nach Bedarf in Kultur (siehe 4.2.1) genommen werden. Die einzufrierende Zellkultur sollte sich hierfür in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Zellen wurden wie für die Kultivierung gelöst (siehe 4.2.1) und zum Abstoppen der Trypsin-Aktivität 10 ml Medium pro 75 cm² Zellwachstumsfläche hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt, bevor sie 10 min bei 800 rpm und 4 °C zentrifugiert wurden (Heraeus Multifuge 1 S-R). Das Suspensionsvolumen an kaltem Medium (inkl. 10 % v/v DMSO) wurde je nach gewünschter Einfrierkonzentration gewählt. Die Abkühlung der Proben erfolgt kontinuierlich um ca. 1 °C/min im Cryo-Einfriergerät bei -80 °C üN mit abschließender Lagerung im flüssigen Stickstoff.

Für die Reaktivierung wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, direkt in Kulturmedium (siehe 3.12.1) aufgenommen und in Zellkulturflaschen vorgelegt. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums um das restliche DMSO und Zelltrümmer zu entfernen. Für die permanente Kultivierung siehe 4.2.1.

4.2.3 Testung auf Mykoplasmenkontamination

Die Zelllinien wurden mittels des Mycoplasma Detection Kits der Firma Roche auf potenzielle Kontaminationen untersucht. Hierfür wurden die Zellen über einen Zeitraum von mindestens 10-12 Tagen in Medium ohne Zugabe von Antibiotika kultiviert. Der Zellüberstand wurde dann nach Herstellerangaben im Elisa auf die Nachweisbarkeit von *M. arginini*, *M. hyorhinae*, *A. laidlawii* und *M. orale* getestet.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Amplifikation von Nukleinsäuren

4.3.1.1 2-Schritt RT-PCR für die Klonierung viraler Genomsegmente

Die Influenza-Genomsegmente wurden für die Klonierung in die Plasmide des Reversen-Genetik-Systems (siehe Anhang 8.2 und Kapitel 4.5.1) mit einer 2-Schritt Reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) amplifiziert. Zunächst wurde die gesamte isolierte Virus Genom-RNA (siehe 4.3.4.4) mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche in cDNA umgeschrieben. Diese parallele Umschreibung aller acht viralen Genomsegmente erfolgte mittels des Uni-12 Primers, der komplementär zu den 12 konservierten Nukleotiden am 3' Ende der vRNA ist (siehe 8.1, beschrieben durch Hoffmann

et. al [28]). Als negative Kontrolle wurde eine Probe ohne RNA angesetzt, die dann im 2. Schritt der RT-PCR ebenfalls als Kontrolle mitgeführt wurde.

Reaktionsansatz: Umschreibung der vRNA in cDNA

2 µl	Uni-12 Primer	[10 µM]
1 µl	RNase-Inhibitor	[50 U/µl]
2 µl	dNTPs	[10 mM]
2 µl	Reaktionspuffer	[10x]
0,8 µl	AMV Reverse Transkriptase	
4 µl	MgCl ₂	[25 mM]
5 µl	RNA	[≤1 µg]
Ad 20 µl	dH ₂ O	

Temperaturprofil:

Zyklen	Temperatur	Zeit	
1	25 °C	10 min	Annealing
1	42 °C	60 min	Reverse Transkription
1	99 °C	5 min	Denaturierung AMV
1	4 °C	5 min	Abkühlen
	8 °C	∞	Lagerung

Im 2. Schritt wurden spezifisch einzelne Gensegmente mit dem Expand High Fidelity PCR System von Roche amplifiziert. Dieses Kit enthält neben der Taq DNA Polymerase die Tgo DNA Polymerase mit Korrekturlesefunktion (3'-5' Exonuklease Aktivität). Eine Übersicht der hierfür verwendeten Oligonukleotid-Primer befindet sich unter 8.1.

Reaktionsansatz: Amplifikation der einzelnen Gensegmente

1 µl	dNTPs	[10 mM]
1,5 µl	Hin-Primer	[10 µM]
1,5 µl	Rück-Primer	[10 µM]
5 µl	Reaktionspuffer inkl. MgCl ₂	[10x]
0,75 µl	Expand High Fidelity Enzym Mix	[2,6 U/0,75 µl]
5 µl	cDNA	
ad 50 µl	H ₂ O	

Temperaturprofil:

Zyklen	Temperatur	Zeit	
1	94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
35	94 °C	25 s	Denaturierung
	40-43 °C	30 s	Annealing
	72 °C	3 min	Elongation
1	72 °C	7 min	abschließende Elongation
	4 °C	∞	Abkühlung/Lagerung

Nach der Amplifikation wurden die Fragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.2) aus dem Gel präpariert (siehe 4.3.4.2) und für die Ligation restringiert (siehe 4.3.5.1 und 4.3.5.2).

4.3.1.2 Überprüfung der Isolatspezifität der Genotypisierungsprimer

Für jedes verwendete Influenzaisolat existiert je ein Plasmid, welches die komplette HA- bzw. NA-Gensequenz kodiert. Ebenso existieren Plasmide mit den NP-Gensequenzen der beiden verwendeten Hintergrundstämme. Diese im Reversen-Genetik-System eingesetzten Plasmide (siehe Kapitel 4.5.1 und Anhang 8.2) wurden zur Kontrolle der Isolatspezifität der Genotypisierungsprimer verwendet. Diese isolatspezifischen Primer dürfen ausschließlich das isolatspezifische Gensegment erkennen und nicht mit einem anderen Isolat kreuzreagieren, um die eindeutige genetische Zusammensetzung der rekombinanten Viren nachweisen zu können. Zur Überprüfung wurden mit jedem Primerpaar PCRs durchgeführt, in denen einzeln alle Plasmide des zu untersuchenden Gensegmentes aller unterschiedlichen Isolate als Template eingesetzt wurden.

Reaktionsansatz: Überprüfung der Isolatspezifität der Genotypisierungsprimer

1 µl	dNTPs	[10 mM]
1 µl	Hin-Primer	[10 µM]
1 µl	Rück-Primer	[10 µM]
5 µl	Reaktionspuffer inkl. MgCl ₂	[10×]
0,25 µl	Taq	[5 U/µl]
2,5 µl	DNA	[0,2 µg/µl]
ad 50 µl	H ₂ O	

Temperaturprofil:

Zyklen	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	30 s	Initiale Denaturierung
30	95 °C	30 s	Denaturierung
	56 °C	30 s	Annealing
	68 °C	1 min	Elongation
1	68 °C	5 min	abschließende Elongation
	8 °C	∞	Abkühlung/Lagerung

Das Ergebnis wurde in einer Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) überprüft.

4.3.1.3 1-Schritt RT-PCR zur Genotypisierung rekombinanter Influenzaviren

Zur Überprüfung der genetischen Zusammensetzung, der mit dem Reversen-Genetik-System (siehe 4.5.1) hergestellten rekombinanten Influenzaviren, wurden Teilfragmente des HA, der NA und des NP mittels isolatspezifischer Primer (siehe Anhang 8.1) unter

Verwendung des OneStep RT-PCR Kit der Firma Qiagen amplifiziert. Das M-Gensegment wurde zur Überprüfung komplett amplifiziert und sequenziert.

Reaktionsansatz: Genotypisierung der rekombinanten Influenzaviren

2 µl	dNTPs	[10 mM]
3 µl	Hin-Primer	[10 µM]
3 µl	Rück-Primer	[10 µM]
10 µl	Onestep RT-PCR Puffer	[5x]
2 µl	Onestep RT-PCR Enzym Mix	
2 µl	RNA	[≤2 µg]
ad 50 µl	H ₂ O	

Temperaturprofil:

Zyklen	Temperatur	Zeit	
1	50 °C		Vorheizen
1	50 °C	30 min	Reverse Transkription
1	95 °C	15 min	Inaktivierung RT/Aktivierung Pol
für HA-, NA- und NP-Teilfragmente:			
30	94 °C	30 s	Denaturierung
	56 °C	30 s	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
für das M-Gensegment:			
35-40	94 °C	30 s	Denaturierung
	40-46 °C	30 s	Annealing
	72 °C	1,20-1,30 min	Elongation
1	72 °C	10 min	abschließende Elongation
	8 °C	∞	Abkühlung/Lagerung

Im Anschluss wurden die Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.3.2). Im Falle der M-Segmente wurden vor der Sequenzierung (siehe 4.3.6) die PCR Reaktionskomponenten mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen (siehe 4.3.4.1) entfernt.

4.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Agarose-Gelelektrophoresen dienen der größenabhängigen Auftrennung von DNA-Molekülen, deren Wandergeschwindigkeit sich im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Fragmentlänge verhält. Die verwendete Konzentration der Agarose richtet sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente, wobei 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (siehe 3.13) für Fragmente zwischen 500-5.000 bp und 2-3 % bei 200-500 bp verwendet wurde. Zur Visualisierung wurde 5 µg/ml Ethidiumbromid im Gel einpolymerisiert. Dieser Farbstoff interkaliert zwischen den Basen der DNA und emittiert Licht bei Anregung

mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$). Bei analytischen Ansätzen wurde 1/10 des PCR-Ansatzes, für präparative die Gesamtreaktion mit 6x DNA-Probenpuffer (siehe 3.1) versetzt und aufgetragen. Die Proben wurden zusammen mit dem für die Größenbestimmung verwendeten Längenstandards (siehe 3.7) bei 100-150 V für 1 h aufgetrennt.

4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der nukleinsäurehaltigen Lösungen erfolgte spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die gemessene optische Dichte in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm gilt:

$OD_{260} 1 = 50 \text{ µg/ml}$ doppelsträngige DNA

$OD_{260} 1 = 40 \text{ µg/ml}$ einzelsträngige RNA

Die Messung erfolgte entweder im Ultraspec 1100pro unter Verwendung einer Quarzküvette oder mittels des ND-1000 Nanodrop Spectrophotometers.

4.3.4 Präparation von Nukleinsäuren

4.3.4.1 DNA-Präparation aus Amplifikationsansätzen

Bevor amplifizierte DNA-Fragmente sequenziert (siehe 4.3.6) oder in Plasmide kloniert (siehe 4.3.5.2) werden können, müssen verbleibende Komponenten der vorangegangenen PCR-Reaktion, wie z.B. Primer, Enzyme und dNTPs, entfernt werden. Hierzu wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen entsprechend den Angaben im Protokoll des Herstellers unter Verwendung einer Zentrifuge eingesetzt. Das abschließende Elutionsvolumen betrug 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5).

4.3.4.2 DNA-Präparation aus Agarosegelen

Die größenabhängige Auftrennung der Fragmente in der Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) ermöglicht die Separation eines gewünschten DNA-Moleküls von anderen potentiellen Nebenprodukten. Um Schädigungen an der DNA zu verhindern wurde zur Visualisierung bei präparativen Ansätzen weniger energiereiches, längerwelliges UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) eingesetzt. Das betreffende DNA-Molekül wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Nukleinsäure mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen aus dem Gel isoliert. Das Elutionsvolumen betrug 20-60 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5). Im Anschluss erfolgte eine Analyse mittels Gelelektrophorese (siehe 4.3.2).

4.3.4.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA für analytische Ansätze erfolgte mit dem QiaPrep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen. Hierfür wurden 5 ml LB-Amp (siehe 3.12.2) mit einer erfolgreich transformierten Einzelkolonie inokuliert (siehe 4.1.2) und die Bakterien schüttelnd über Nacht bei 37 °C im Innova 40 Inkubator angezogen. Aus 1,5-2 ml Kultur wurde die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert und in einem Endvolumen von 50 µl 10 mM Tris-HCl, (pH 8,5) aufgenommen.

Die präparativen Ansätze der Plasmid-DNA für das Reverse-Genetik-System (siehe 4.5.1) wurden mit dem HiSpeed Plasmid Maxi Kit derselben Firma durchgeführt. Zum Animpfen der 150 ml LB-Amp Kultur wurden 500 µl einer vorab angezogenen Vorkultur verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht schüttelnd bei 37 °C im Innova 40 Inkubator. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min, bei 4 °C und 4.700 rpm zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1 S-R) und die Plasmid-Präparation nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde mit 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris/1 mM EDTA pH 8,0) eluiert und vor der Lagerung bei -20 °C wurde ihre Konzentration bestimmt (siehe 4.3.3).

4.3.4.4 Präparation viraler RNA

Die Präparation der viralen RNA erfolgte mit dem High Pure-Isolation Kit der Firma Roche. Hierfür wurden 300-1.500 µl virushaltiger Zellkulturüberstand (siehe 4.5.2.2) oder Allantoisflüssigkeit infizierter Hühnereier (siehe 4.5.2.1) bei 40.000 rpm und 4 °C für 1 h zentrifugiert (Optima TL-100 Ultrazentrifuge, bzw. Optima L-80xp mit dem SW60Ti Rotor) und das Viruspelett in 200 µl PBS^{def} suspendiert. Die Präparation der Nukleinsäure erfolgte entsprechend der Angaben des Protokolls des Herstellers zur Isolierung von RNA aus Zellkultur. Das Elutionsvolumen betrug 20-50 µl nukleasefreies, steriles, doppelt destilliertes Wasser und die Lagerung erfolgte anschließend bei -80 °C. Die vRNA wurde für die Amplifikation der Gensequenzen (siehe 4.3.1.1) verwendet.

4.3.5 Modifizierung von Nukleinsäuren

4.3.5.1 Präparative und analytische Restriktionsverdaue

Die Klonierung der Influenza-Gensegmente (siehe 4.3.1.1) in die Plasmide des Reversen-Genetik-Systems (siehe 4.5.1) erfolgte über Esp3I (Isoschizomer: BsmBI) Restriktion. Diese Endonuklease hydrolysiert die Phosphodiesterbindung der DNA an einer definierten Stelle außerhalb ihrer Erkennungssequenz. Dabei entsteht am 5'-Ende ein vier Basen langer Überhang, dessen Sequenz über die in der RT-PCR verwendeten Primer festgelegt wurde. 0,5-2 µg DNA wurden mit 10-20 U Esp3I für 9 h bei 37 °C in dem vom Hersteller

empfohlenem Puffer unter Zugabe vom 1 mM frisch angesetztem DTT hydrolysiert. Die Plasmide wurden direkt im Anschluss dephosphoryliert (siehe 4.3.5.2). Die abgespaltenen, kurzen DNA-Fragmente und weiteren Reaktionskomponenten wurden durch Auftrennung in der Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) entfernt und die mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (siehe 4.3.4.2) isolierten DNA-Fragmente ligiert (siehe 4.3.5.2).

Zur Überprüfung der Klonierung wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt. Die entsprechende Enzymkombination (siehe 8.2) wurde so gewählt, dass nach Möglichkeit einmal im Vektor und einmal im Insert geschnitten wurde. Die Bedingungen aller Restriktionsverdaue richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Es wurde insgesamt eine Enzymmenge von 20 U zur Hydrolyse von 5 µl Plasmid-DNA (siehe 4.3.4.3) für 1-1,5 h bei 37 °C eingesetzt. Die erhaltenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) aufgetrennt.

4.3.5.2 Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verhinderung einer Rezirkulation wurden die terminalen 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmide mit der *calf intestine* alkalischen Phosphatase der Firma Fermentas entfernt. Dieser Schritt wurde direkt nach der Restriktion (siehe 4.3.5.1) und vor der Auftrennung in der Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) durchgeführt. Der Restriktionsansatz wurde mit dem 10x Reaktionspuffer komplementiert und 1 U Phosphatase zugegeben. Die 30-minütige Reaktion erfolgte bei 37 °C, gefolgt von einer 15-minütigen Inaktivierung der Phosphatase bei 85 °C.

Für die Ligation wurde ein Verhältnis Vektor zu Insert von 1:3 bzw. 1:5 gewählt, wobei 20 ng oder 100 ng Vektor DNA eingesetzt wurden. Die entsprechend benötigte Insertmenge wurde über den Ligationskalkulator der Universität Düsseldorf (www.insilico.uni-duesseldorf.de [147]) errechnet oder anhand einer Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) abgeschätzt. In einen 20 µl Reaktionsansatz wurden 5-10 U Ligase eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 22 °C für eine Stunde, mit nachfolgender 10-minütiger Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C. Es wurden folgende Kontrollen mitgeführt: eine negative Kontrolle, bei der kein Insert zugegeben wurde und nur die nicht komplementären Enden des Vektors vorhanden waren, sowie ein Ansatz zur Kontrolle der Ligase, zu dessen Zweck ein mit PvuII linearisierter Vektor eingesetzt wurde. Jeweils 5 µl der Reaktion wurden in chemisch kompetente Bakterienzellen transformiert (siehe 4.1.2).

4.3.6 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon aus Ebersberg durchgeführt. Pro Ansatz wurden 15 µl Primer (siehe 8.1) mit einer Konzentration von 2 pmol/µl benötigt. Die zu sequenzierenden, gereinigten DNA-Moleküle mussten in einem Mindestvolumen von 15 µl 5 mM Tris-HCl (pH 8,5) gelöst vorliegen. Bei Plasmiden wurden 50-100 ng/µl, bei PCR-Fragmente mit einer Größe bis 1.000 bp 5 ng/µl und über 1.000 bp 10 ng/µl benötigt. Die Konzentrationsbestimmung der zu sequenzierenden Proben erfolgte photometrisch (siehe 4.3.3), die Sequenzauswertung und Bearbeitung mit dem Programm VectorNTI von Invitrogen.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur größenabhängigen Proteinauftrennung wurde die diskontinuierliche SDS Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Die Matrix besteht aus linearen Polyacrylamidketten, die mittels N-N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. Die Durchlässigkeit dieser Netz-Struktur ist dabei abhängig von der eingesetzten Acrylamidkonzentration und stellt einen proportional zur Molekülgröße wirkenden Widerstand dar. Durch Zugabe des anionischen, denaturierenden Detergenz Natriumdodeylsulfat (*Sodiumdodeylsulfat*=SDS) wird eine Trennung im elektrischen Feld unabhängig von der Eigenladung der Moleküle ermöglicht.

1,5 ml virushaltige Allantoisflüssigkeit wurde für 1 h bei 4 °C und 40.000 rpm zentrifugiert (Optima TL-100 Ultrazentrifuge, bzw. Optima L-80xp mit dem SW60Ti Rotor) und das Viruspelett in 200 µl PBS^{def} inklusive des Proteaseinhibitor-Cocktails Complete der Firma Roche suspendiert. Für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific entsprechend der Herstellerangaben zur Durchführung in 96-well Mikrotiterplatten verwendet. Es wurden für jede Probe zwei Verdünnungen in Doppelbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurde die Allantoisflüssigkeit aus infizierten Hühnereiern (siehe 4.5.2.1) direkt in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben wurden mit 6x Proteingel-Probenpuffer (siehe 3.13) versetzt und zum Aufbrechen der Sekundärstrukturen für 5 min bei 95 °C gekocht. Zunächst wurde eine Fokussierung der Proteine im weitmaschigen 5 %-igen Sammelgel (pH 6,8) durchgeführt, bevor die Separation im 10 %-igem Trenngel (pH 8,8) erfolgte (siehe 3.13). Für die Größenabschätzung der im Gel aufgetrennten Proteine wurde ein Längenstandard (siehe 3.7) mitgeführt. Bei dem verwendeten SDS-Laufpuffer (siehe 3.13) handelt es sich um ein Tris-Glycin-Puffersystem.

Die Spannung betrug für das Einlaufen der Proben 80 V für 15 min und 120-200 V für ca. 45 min bis zum Austreten der Lauffront. Die Elektrophorese wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt, wodurch die Trennung der Untereinheiten HA₁ und HA₂, durch Reduktion der sie verbindenden Disulfidbrücke, verhindert wurde. Zur Visualisierung wurde zum einen das Novex Colloidal Blue Staining Kit der Firma Invitrogen und zum anderen das Silver Staining Kit der Firma GE Healthcare entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

4.4.2 Westernblot und Immunodetektion im Odyssey-System

Die in der SDS-PAGE (siehe 4.4.1) aufgetrennten Proteine wurden für den immunologischen Nachweis auf eine Protran Nitrocellulose Transfer Membran BA 85 mit einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Die Übertragung erfolgte mittels des Tank Blot Verfahrens in einer Mini Trans-Blot Elektrophorese Einheit der Firma BioRad. Der einstündige Transfer wurde nach Angaben des Herstellers bei 350 mA durchgeführt. Bei dem Verfahren wurde das Gel und die Membran von jeweils mit Transferpuffer (siehe 3.13) getränkten Whatman-Papieren sowie Schwämmen eingerahmt und die Membran in Richtung Anode positioniert. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur positiven Elektrode und binden durch hydrophobe Wechselwirkungen irreversibel an die Membran. Nach der Übertragung wurde die Membran kurz in PBS-T (siehe 3.13) geschwenkt und um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern über Nacht bei 4 °C in Blockingpuffer (siehe 3.13) inkubiert. Die primären Antikörper oder Antiseren (siehe 3.6.1) wurden entsprechend ihrer einzusetzenden Verdünnung in PBS-T mit 1 % BSA verdünnt und die Membran für eine Stunde bei RT unter Schwenken inkubiert. Vor Zugabe des sekundären IRDye Farbstoff gekoppelten Antikörpers (siehe 3.6.2) wurden die Membranen 3 × für 10 min in PBS-T gewaschen. Nach einstündiger Inkubation bei RT erfolgten erneut drei Waschschrte. Die Visualisierung erfolgte mittels des Odyssey Infrared Imaging Systems der Firma Licor und die Auswertung über die korrespondierende Software.

4.5 Virologische Methoden

Alle Arbeiten mit infektiösem Material erfolgten an einer Sicherheitswerkbank der Stufe 2 (Heraeus LaminAir HLB 2472 GS).

4.5.1 Herstellung rekombinanter Influenza Viren mit dem Reverse-Genetik-System

Das Reverse-Genetik-System nach Neumann *et. al* [77] ermöglicht es Influenzaviren vollständig anhand von cDNA herzustellen (siehe ausführliche Darstellung in der Einleitung Kapitel 2.1.6). Hierfür wurden 293T-Zellen parallel mit acht RNA-Pol I Plasmiden, die für die

Gensegmente kodieren und vier RNA-Pol II Expressionsplasmiden für die minimale Replikationseinheit, bestehend aus den drei Polymerasen und dem NP-Protein, transfiziert. Die Methode gestattet es gezielt Reassortanten mit einer definierten genetischen Zusammensetzung zu generieren. Für die Doppel-Reassortanten wurden die Oberflächenproteine HA und NA unterschiedlicher Isolate (siehe 3.10) in die beiden zu vergleichenden Hintergrundstämme eingebracht. Zusätzlich wurden Triple-Reassortanten erzeugt, die neben den Oberflächenproteinen auch das isolatspezifische M-Protein trugen.

Zur Erzeugung der Viren wurden pro Plasmid 1 µg DNA eingesetzt. Eine Ausnahme bildete das PA Expressionsplasmid, bei dem nur ein Fünftel und das HA kodierende Plasmid bei dem die doppelte DNA-Menge eingesetzt wurde. Als negative Kontrolle wurden Ansätze mitgeführt, bei denen die auszutauschenden Gensegmente weggelassen wurden. Die 12,2 µg DNA zur Erzeugung eines rekombinanten Influenzavirus wurden in 250 µl Opti-MEM I mit GlutaMax gegeben. In einem parallelen Ansatz wurden pro Transfektionsansatz 20 µl Liposomenreagenz Lipofectamin2000 mit 230 µl OptiMEM vermischt. Beide Ansätze wurden vor der Vereinigung für 10 min bei RT inkubiert und nach dem Mischen für weitere 20 min stehen gelassen. 293T-Zellen, die am Vortag umgesetzt wurden und sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden abgelöst und mit einer festen Zellzahl (siehe 4.2.1) in 21 cm² Schalen mit 2,5 ml DMEM Kulturmedium (siehe 3.12.1.1) vorgelegt. Zu den noch in Suspension befindlichen Zellen wurde der Transfektionsansatz tropfenweise unter schwenken zugegeben. Nach 16-20 h waren die Zellen adhärirt, so dass das Medium entfernt werden konnte und durch 5 ml DMEM^{Inf} ersetzt wurde. Weitere 24 h später erfolgte der Transfer des Zellüberstandes auf 24 h zuvor mit einer festen Zellzahl (siehe 4.2.1) eingezählten MDCK-Zellen. Dazu wurden die vorgelegten, adhärennten MDCK-Zellen mit PBS⁺⁺/0,2 % BSA (siehe 3.13) gewaschen und für 1 h mit 1 ml des Überstandes der transfizierten 293T-Zellen bei 37 °C unter schwenken inkubiert. Im Anschluss erfolgten ein weiterer Waschschrirt und die Zugabe von 5 ml MEM^{Inf}. Nach 2-3 Tagen wurde der Zellüberstand abgenommen und zur Entfernung der Zelltrümmer bei 4 °C und 2.000 rpm für 15 min zentrifugiert (Multifuge 1 S-R). Der Virustiter des virushaltigen Überstandes wurde mittels Hämagglutinationstest (siehe 4.5.3) ermittelt und anschließend die Viren bei -80 °C gelagert.

Zur Selektion genetisch identischer Klone wurden im Anschluss an das Virusresue drei Plaque-Passagen in MDCK-Zellen durchgeführt (siehe 4.5.4) und abschließend zur Vermehrung der Viren MDCK-Zellen infiziert (siehe 4.5.2.2). Zur Identifizierung des

Genotypes der Viren wurde RNA präpariert (siehe 4.3.4.4) und eine isolatspezifische RT-PCR (siehe 4.3.1.3) durchgeführt.

4.5.2 Virusvermehrung

4.5.2.1 Anzucht im embryonierten Hühnerei

Für die Vermehrung der Influenzaviren in embryonierten Hühnereiern wurden Eier verwendet, deren spezifisch pathogen freier Status (SPF) einer ständigen Überprüfung durch den Lieferanten Valo BioMedia unterliegt. Die zehntägige Vorbebrütung erfolgte bei 37 °C mit einem Wenderhythmus von 8 mal pro 24 Stunden und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Vor der Infektion wurden die Eier zur Überprüfung der Embryonen mit einer Schierlampe durchleuchtet. Für die Infektion wurde dann die Eischale im Bereich der Luftblase oberflächlich mit einer Jodlösung desinfiziert und ein Loch zur Applikation hinein gebohrt. Die Injektion von 0,2 ml Viruslösung unterschiedlicher Verdünnungsstufen (10^{-2} bis 10^{-8}) in PBS^{def} erfolgte mit einer stumpfen Kanüle (0,8 × 22 mm), die vollständig senkrecht eingeführt wurde. Zum Verschließen des Lochs wurde Ponal Express Holzleim verwendet. Die Postinfektionsbebrütung erfolgte bei gleicher Luftfeuchtigkeit jedoch bei 36 °C ohne Wendung. Nach 48 h Inkubation wurden die Eier über Nacht bei 4 °C abgekühlt, um die Embryonen abzutöten und eine Kontraktion der Blutgefäße zu bewirken.

Für die Ernte der virushaltigen Allantoisflüssigkeit wurde die Schale im Bereich der Luftblase entfernt, der Embryo und Dottersack mit einem sterilen Löffel zur Seite gedrückt und die Allantoisflüssigkeit mit einer Einmalpipette abgenommen. Anschließend wurde die Flüssigkeit zur Entfernung von Blutkomponenten und Zellresten 15 min bei 4 °C und 2.000 rpm in der Multifuge 1 S-R zentrifugiert. Der Virustiter des virushaltigen Überstandes wurde mittels Hämagglutinationstest bestimmt (siehe 4.5.3) und die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur Verifizierung der genetischen Zusammensetzung der Viren wurde RNA präpariert (siehe 4.3.4.4) und eine isolatspezifische RT-PCR durchgeführt (siehe 4.3.1.3).

4.5.2.2 Anzucht im Zellsystem zur Vermehrung und zum Replikationsvergleich

Alternativ zu embryonierten Hühnereiern eignen sich unterschiedliche Zelllinien wie MDCK II und Vero zur Virusvermehrung. Am Vortag der Infektion wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl vorgelegt (siehe 4.2.1). Die ca. 80-90 % konfluent gewachsenen Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS⁺⁺/0,2 % BSA (siehe 3.13) gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer definierten MOI (*multiplicity of infection* entspricht der Anzahl der infektiösen Viren pro Zelle) oder einer festgelegten Virusverdünnung in PBS⁺⁺/0,2 % BSA infiziert. Für die Infektion einer Vertiefung einer 6-well Zellkulturplatte wurden 0,5 ml

Inokulum verwendet, für die Infektion von 25; 75 bzw. 175 cm² Zellkulturflaschen 1,5; 3 bzw. 5 ml. Als negative Kontrolle wurde als Inokulum ausschließlich PBS⁺⁺/0,2 % BSA ohne Virus eingesetzt.

Zur Virusvermehrung nach der klonalen Selektion mittels Plaque-Assay (siehe 4.5.4) wurde die Hälfte des 200 µl Ansatzes 1/20 mit PBS⁺⁺/0,2 % BSA verdünnt und zur Infektion einer Fläche von 75 cm² verwendet. Die Bindung der Viren an die Zellen erfolgte für eine Stunde bei 37 °C unter Schwenken (Platform Rotierer PS 3D). Nicht gebundene Viren wurde anschließend durch dreimaliges waschen mit PBS⁺⁺/0,2 % BSA entfernt und je nach Zelllinie ca. 5 ml pro 25 cm² Trypsin-haltiges Medium für Infektionsversuche (siehe 3.12.1.2) hinzugegeben. Die Virusproliferation erfolgte im CO₂-Inkubator C200 bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % Luftfeuchtigkeit.

Für den Replikationsvergleich unterschiedlicher Viren wurden zu ausgewählten Zeitpunkten virushaltiger Zellüberstand abgenommen und mittels Hämagglutinationstest (siehe 4.5.3) oder durch Bestimmung des PFU-Titers (siehe 4.5.4) die Virusmenge bestimmt. Vor der Lagerung der virushaltigen Zellüberstände bei -80 °C. wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4 °C und 1.500 rpm für 15 min entfernt (Multifuge 1 S-R). Zur Verifizierung der genetischen Zusammensetzung der Viren wurde RNA präpariert (siehe 4.3.4.4) und eine isolatspezifische RT-PCR durchgeführt (siehe 4.3.1.3).

4.5.3 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der Hämagglutinationstest basiert auf der Eigenschaft der Influenzaviren mittels ihres HA an die endständigen Neuraminsäuren auf der Oberfläche von Erythrozyten zu binden. Diese Methode unterscheidet dabei nicht zwischen infektiösen Partikeln und nichtinfektiösen Komponenten wie z.B. Membrantrümmern oder defekten Viren. Im HA-Test werden bei ausreichend hoher Anzahl viraler Partikel im Verhältnis zu den Blutzellen alle Erythrozyten vernetzt (Hämagglutination), ist jedoch der Anteil an viralen Partikeln zu niedrig, sedimentieren nicht gebundene Erythrozyten ab. Der Hämagglutinationstiter (HA-Titer) ist der reziproke Wert der höchsten Virusverdünnung, bei der die vollständige Hämagglutination einer festgelegten Erythrozytenkonzentration erfolgt.

Für den HA-Test wurde sowohl Hühner- als auch Meerschweinchenblut aus der hauseigenen Tierhaltung verwendet. Das Vollblut lag in Alsever-Lösung (siehe 3.12) vor, wurde bei 4 °C und 1.000-1.500 rpm für 15 min zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1 S-R). Die Zellen wurden zweimal mit 0,85 % NaCl-Lösung gewaschen, bevor eine 0,5 %-ige Hühner- bzw. 0,75 %-ige Meerschweinchenerythrozyten Lösung angesetzt wurde [148]. Für die Bestimmung des HA-Titers wurde eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden

virushaltigen Lösung angefertigt. Hierfür wurden zunächst 50 µl PBS^{HA} mit Ausnahme der ersten Spalte in alle Vertiefungen einer 96-*well* Mikrotiterplatte (MTP) gegeben. In die freie erste Spalte wurden jeweils 100 µl Viruslösung vorgelegt, von der zur Herstellung der Verdünnungsreihe ausgehend sukzessive 50 µl in die nachfolgenden Vertiefungen transferiert wurden. Anschließend wurden zu den 50 µl Virusverdünnung jeweils 50 µl Erythrozytenlösung zugegeben, mittels eines MTP-Schüttler vermischt und für 45-60 min bei 4 °C inkubiert. Bei den Hühnererythrozyten wurden V-förmige MTPs verwendet und der HA-Titer ließ sich durch leichtes Schräghalten der Platten ermitteln. Bei Meerschweinchenerythrozyten wurden U-förmige MTPs eingesetzt und die sedimentierten Blutzellen bildeten einen Ring. Als negative Kontrolle wurde nur PBS ohne Virus verwendet.

4.5.4 Plaque-Assay zur Titrierung infektiöser Einheiten und zur klonalen Selektion

Im Gegensatz zum HA-Test (siehe 4.5.3) ist es mittels Plaque-Assay möglich eine Aussage über die Anzahl der infektiösen Viruseinheiten in einer Lösung zu erhalten. Die am Vortag mit einer festen Zellzahl (siehe 4.2.1) in einer 6-*well* Zellkulturplatte vorgelegte MDCK-Zellen wurden dreimal mit PBS⁺⁺/0,2 % BSA (siehe 3.13) gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 0,5 ml Infektionslösung bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Zur Ermittlung des PFU-Titers (*plaque forming units*) wurden 6 Stufen einer 1:10 Verdünnungsreihe im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-10} der Viruslösung in PBS⁺⁺/0,2 % BSA eingesetzt und zur Kontrolle zusätzlich Zellen ausschließlich mit PBS⁺⁺/0,2 % BSA inkubiert. Nicht gebundene Viren wurden durch dreimaliges waschen entfernt und pro Vertiefung anschließend 3 ml MEM^{OV} (siehe 3.12.1.2) zugegeben. Die Agarschicht bewirkte, dass die im Verlauf der Infektion neu freigesetzten Viren nur direkt benachbarte Zellen infiziert konnten. Folglich ist jeder Plaque ein lokal begrenzter Bereich zerstörter Zellen, der sich auf die Infektion mit einem einzelnen Viruspartikel zurückführen lässt.

Bei der klonalen Selektion wurde nach 24 bis 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einer sterilen Pipettenspitze die Agaroseschicht über vereinzelt Plagues ausgestochen, um die hieraus isolierten Viren in weiteren Selektionsrunden einzusetzen. Dafür wurde die ausgestochene, virushaltige Agarschicht in 200 µl PBS⁺⁺/0,2 % BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert, währenddessen die Viren in das PBS diffundierten. Von diesem Ansatz ausgehend wurden weitere Plaque-Passagen durchgeführt, bei denen die eingesetzten Verdünnungen in einem Bereich von 10^{-1} bis 10^{-6} lagen. Nach der dritten Passage wurde zur Vermehrung der Viren ein größerer Zellkulturansatz infiziert (siehe 4.5.2.2).

Für die Bestimmung des PFU-Titers pro ml wurde zur besseren Visualisierung die Agarschicht 72 h nach Infektion mit 3 ml Kristallviolett-Färbelösung (siehe 3.13)

überschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Kristallviolett färbt die lebenden Zellen an, nicht jedoch die durch das Virus zerstörten Bereiche. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgenommen, die Agarschicht vorsichtig mit einem Spatel entfernt und die Zellschicht mit destilliertem Wasser gespült. Nach dem Trocknen wurde die Anzahl der Plaques ausgezählt.

4.5.5 Einfacher radialer Immundiffusionstest (SRID)

Der einfache radialer Immundiffusionstest (*single-radial-Immunodiffusion-assay*=SRID) ist eine immunologische Nachweismethode zur Quantifizierung des HA-Antigengehaltes einer Probe im Bezug zu einer Referenz mit einer bekannten Konzentration [149]. Die stammspezifischen Antiseren (siehe 3.6.1) werden hierbei in der Agarose immobilisiert, in die dann die Referenz sowie die Proben, deren Antigengehalt ermittelt werden soll, appliziert werden. Die Proben diffundieren ausgehend von der Auftragsstelle radial in die Agarose ein, in der eine homogene Antiserumkonzentration vorliegt. Innerhalb der Agaroseschicht kommt es in dem Bereich, wo ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Antikörpern und Antigenen besteht, zur Ausbildung unlöslicher Immunopräzipitationskomplexe. Diese können aufgrund der erhöhten Proteinkonzentration durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht werden. Die benötigte Diffusionsstrecke bis zum diesem Präzipitationspunkt ist proportional zu der Antigenkonzentration der Probe. Somit stellt die Größe der Fläche des Präzipitationsringes ein Maß für die Antigenmenge in der Probe da und kann über eine mitgeführte Referenz quantifiziert werden.

1 % (w/v) Agarose wurde in PBS^{SRID} (siehe 3.13) zum Lösen erhitzt und nach Abkühlen auf 56 °C die entsprechende Antiserummenge (siehe 3.6.1) zugegeben. Zum Herstellen der Agaroseplatten wurde ein 1 cm breiter, abnehmbarer Rahmen auf einer 12 × 12 cm großen Glasplatte befestigt und der Innenbereich mit 21 ml Agarose gefüllt. Nachdem die Agarose festgeworden war, wurden 36 Löcher mit einem Durchmesser von 4 mm hinein gestanzt und die Platten anschließend für 10 min bei RT getrocknet. Die Referenzantigene wurden in 1 ml destilliertem Wasser für 10 min bei RT gelöst. Zu jeweils 900 µl Virusprobe oder Referenzantigen wurden 100 µl Zwittergent (siehe 3.13) zugegeben und die Proben 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Referenzen mit PBS^{SRID} auf die unter Kapitel 3.6.3 aufgeführten Antigengehalte eingestellt und entsprachen dann den unverdünnten Ansätzen, von denen jeweils drei unabhängige 2:3 und 1:3 Verdünnungen mit PBS^{SRID} hergestellt wurden.

Pro Agaroseplatte konnten neben der Referenz jeweils drei Proben analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden 20 µl Probe in ein Loch gegeben, wobei jede Verdünnungsstufe einmal am Rand und einmal in der Mitte aufgetragen wurde. Im Unterschied zu virushaltiger

Allantoisflüssigkeit wurde bei Zellkulturüberständen nach 30-60 min erneut 20 µl Probe appliziert und in diesem Fall bei den Referenzen 20 µl PBS^{SRID} zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation auf einem Nivelliertisch wurden die Platten in eine feuchte Kammer überführt und die Diffusion der Proben erfolgte für 22 h bei RT. Anschließend wurden die Rahmen entfernt, die Löcher mit destilliertem Wasser gefüllt und je zwei Lagen Filterpapier sowie Papiertücher, eine Glasplatte und ein 650 g schweres Gewicht zum Trocknen auf die Agarose gelegt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden bis auf das innerste Filterpapier alle Schichten entfernt und der Pressvorgang wiederholt. Das unterste Filterpapier verblieb anschließend auf der Agarose und die Platten wurden für ca. 1 h bei RT getrocknet. Zur Visualisierung der Präzipitationsringe wurden die Platten für ca. 5-10 min in SRID-Färbelösung unter Schwenken gefärbt, gefolgt von einer Inkubation in SRID-Entfärbelösung (siehe 3.13) bis zu dem Zeitpunkt an dem ein guter Kontrast zwischen den angefärbten Präzipitationsringen und dem Hintergrund erreicht war. Zum Trocknen bei RT wurden die Platten über Nacht senkrecht gestellt.

Für die Auswertung wurden die Platten eingescannt und die Ringflächen mittels der Metric Software über eine drei-Punkt-Messung ausgemessen. Der Gehalt der Antigenmenge konnte durch den Vergleich der Fläche mit der Ringgröße der Referenz mittels des Combistats Programmes ermittelt werden.

4.5.6 Neuraminidase Aktivitätsassay

Der Neuraminidase Aktivitätsassay weist über eine Farbreaktion der Thiobarbitursäure (TBA) die durch die Neuraminidase enzymatisch vom Fetuin abgespalteten freien Sialinsäuren nach [148]. Die zu vergleichenden Viren wurden anhand der SRID Ergebnisse (siehe 4.5.5) auf 3 bzw. 4 µg/ml HA mit PBS⁺⁺/0,1 % BSA (siehe 3.13) eingestellt. Als Referenz zur Normalisierung wurde kommerziell erwerbliche *Vibrio cholerae* Neuraminidase (V.c. NA) mit 1,61 U/ml der Firma Fluka eingesetzt, die vorab 1/100 bzw. 1/1.000 in PBS⁺⁺/0,1 % BSA verdünnt wurde. Anschließend wurden für jede Probe jeweils drei unabhängige Verdünnungsreihen hergestellt. Hierfür wurde in alle Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte, ausgenommen der ersten Reihe, 50 µl PBS⁺⁺/0,1 % BSA gegeben. In die erste Reihe wurden jeweils 100 µl auf eine feste HA-Menge eingestellte Viruslösung, Standard oder für die Leerwertbestimmung PBS⁺⁺/0,1 % BSA ohne Neuraminidase vorgelegt und durch sukzessiven Transfer von 50 µl in die nachfolgende Vertiefung eine 1:2 Verdünnungsreihe der Proben hergestellt (2⁰ bis 2⁷).

In PCR-Reaktionsgefäße wurden 5 µl der verdünnten Probe mit 5 µl Fetuin (25 mg/ml) vereinigt (siehe 3.13). Die Ansätze wurden für 16-22 h bei 37 °C inkubiert und nach

Abkühlung auf RT jeweils 5 µl Perjodat Reagenz (siehe 3.13) hinzugeben gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation bei RT. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 25 µl Arsenit-Lösung zugegeben (siehe 3.13) und anschließend die Proben bis zum Verschwinden der gelben Farbe gevortext. Als nächstes wurde 50 µl TBA-Substrat (siehe 3.13) zugeben, erneut gemischt und für 15 min bei 99 °C im Heizblock erhitzt, während dessen sich der photometrisch messbare rosa Farbstoff entwickelte. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis gestellt, anschließend 75 µl Warrenoff-Reagenz (siehe 3.13) zugegeben und gevortext. Zur Ausbildung der Phasentrennung wurden die Proben kurz zentrifugiert (Galaxy Mini) und anschließend 50 µl der obere Phase in eine U-förmige 96-well MTP transferiert.

Die Absorptionsmessung erfolgte bei 550 nm im Rainbow Photometer der Firma Tecan. Zur Auswertung wurden die Daten der dreifachen Bestimmung gemittelt und der gemittelte Messwert des Leerwertes hiervon subtrahiert. Die Werte der jeweiligen Verdünnungsstufen wurden ins prozentuale Verhältnis zu den entsprechenden Ergebnissen des V.c.NA-Standards gesetzt und der Mittelwert aus allen Verdünnungsstufen errechnet. Zum Vergleich der beiden Hintergrundstämme wurde das Verhältnis der gemessenen NA-Aktivität zwischen den FPVmut- und den entsprechenden PR8-Reassortanten ermittelt.

4.5.7 Viruspartikel Anreicherung über einen Sucrose-Stufen-Gradient

Mit einer Dichtegradientenzentrifugation können Moleküle mit unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten voneinander getrennt werden bei gleichzeitiger Konzentrierung der Probe. Für die Anreicherung der Influenzaviren wurde ein Stufengradient verwendet, für dessen Herstellung 5 ml einer 60 %igen Sucroslösung mit 5 ml einer 30 %igen Lösung (siehe 3.13) in einem Zentrifugenröhrchen überschichtet wurden. Die Viren lagern sich während der Zentrifugation an der Grenzschicht der beiden Sucroslösungen an. Voraussetzung für eine scharf abgetrennte, sichtbare Virusbande ist das Auftragen einer ausreichenden Menge an viralem Material in einem möglichst geringen Volumen.

Bis zu 15 ml virushaltiger Lösung wurden mittels einer Amicon Ultra-15 100 kDa Ultrafiltrationseinheit der Firma Millipore auf ein maximales Volumen von 1,5 ml konzentriert. Hierfür wurde die Probe für 15-45 min bei 4000 rpm und 4 °C (Multifuge 1 S-R) über die Membran der Filtereinheit mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa filtriert. Die angereicherte Virusprobe wurde anschließend auf den Gradienten geschichtet. Die Auftrennung über den Dichtegradienten erfolgte für 16 h bei 4 °C und 24.100 rpm in der Optima L-80xp Zentrifuge mit dem SW41Ti Rotor bei abgeschalteter Bremse. Die in der Interphase entstandene Virusbande wurde mit einem möglichst geringen Volumen entnommen und in einem maximalen Endvolumen von 4 ml PBS^{def} suspendiert. Um die Sucrose zu entfernen und die

Probe erneut anzureichern wurde eine Amicon Ultra-4 100 kDa Filtereinheit verwendet. Diese besitzt im Vergleich zu der zuvor verwendeten eine kleinere Filtermembranfläche. Im Bezug zum ursprünglichen Ausgangsvolumen wurden die Proben bei 4 °C und 4.000 rpm für 10-35 min um den Faktor 200 eingengt. Die Präparation konnte anschließend für die Elektronenmikroskopie eingesetzt werden (siehe 4.5.8).

4.5.8 Morphologie-Analyse im Elektronenmikroskop

Für die morphologische Betrachtung der Influenzaviren im Elektronenmikroskop mussten zuvor die über einen Gradienten aufgetrennten und konzentrierten Virusproben (siehe 4.5.7) inaktiviert werden indem sie mit einer Endkonzentration von 2 % (v/v) Formaldehyd (siehe 3.13) für 30 min bei RT inkubiert wurden. Für die Betrachtung der Präparate im Elektronenmikroskop wurden Nickel300 Trägernetzchen verwendet. Diese wurden im Ultraschallbad in Alkohol gereinigt, bevor sie mit einer Kunststoffschicht befilmt und anschließend einer Kohlebedampfung unterzogen wurden. Zur Hydrophilisierung wurden die Netzchen zeitnah vor der Verwendung beglimmt. Für die Adhäsion der im Elektronenmikroskop zu betrachtenden Viren an die Trägernetzchen wurden letztere für 5 min bei RT auf einen 10 µl Tropfen der virushaltigen Lösung gelegt, gefolgt von zwei Waschschritten mit destilliertem Wasser. Die an die Trägernetzchen adhärten Viren wurden für 10 s mit einer 2 %igen Uranylacetat-Lösung negativkontrastiert und das überschüssige Kontrastmittel anschließend mit einem Filterpapier abgesaugt bevor die Präparate im EM 109 Elektronenmikroskop betrachtet wurden.

Das Fachgebiet Morphologie am Paul-Ehrlich-Institut hat freundlicherweise die vorbereiteten Trägernetzchen zur Verfügung gestellt, sowie die Mikroskopie am EM 109 durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Vergleich der Replikationseigenschaften von FPVmut und PR8

Der PR8-Virusstamm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) ist aufgrund seiner guten Wachstumseigenschaften und den daraus resultierenden hohen Antigenausbeuten in verschiedenen Proliferationssystemen der von der WHO empfohlene Akzeptorstamm für die Produktion von Influenzaimpfstoffsaatviren [75;102;150]. Die mit dem PR8 gebildeten Influenza-Reassortanten besitzen in aller Regel ebenfalls diese für die Impfstoffproduktion notwendigen positiven Wachstumsmerkmale und werden aufgrund dessen als Saatviren in der Impfstoffherstellung eingesetzt [102-104]. Zentrale Voraussetzungen für die potenzielle Verwendung des FPVmut als Alternative zu PR8 sind somit mindestens gleiche Wachstumscharakteristiken, wie das Replikationsverhalten und eine mit PR8 vergleichbare oder höhere Antigenausbeute. Für die Sicherheitsbestimmungen im Produktionsmaßstab ist es zusätzlich notwendig, dass die zu vermehrenden Viren niedrigpathogen sind.

5.1.1 FPVmut weist *in vitro* einen niedrigpathogenen Phänotyp auf

Niedrigpathogene Influenzaviren besitzen eine mono- oder dibasische Erkennungssequenz im HA-Spaltmotiv und sind dadurch gekennzeichnet, dass sie in den meisten Zellkulturen nur nach externer Zugabe von Trypsin replizieren können [46;151]. Bisher konnte der niedrigpathogene Phänotyp des FPVmut im aviären System sowie in MDCK-Zellen nachgewiesen werden [83]. Ergänzend zu diesen Ergebnissen sollte das Replikationsverhalten des FPVmut in weiteren zusätzlichen Zellkultursystemen untersucht werden. Hierfür wurden Primaten Vero-Zellen, humane A549-Lungenepithelzellen sowie als Kontrolle erneut canine MDCK-Zellen infiziert (siehe Abbildung 5-1). In den Graphen ist der zeitliche Verlauf der Virusreplikation anhand des mit Hühnererythrozyten ermittelten HA-Titers im Zellüberstand dargestellt. In allen untersuchten Zellsystemen konnte die Virusreplikation nur bei Zugabe von Trypsin erfolgen.

Somit konnte in dieser Arbeit der vollständig niedrigpathogene Phänotyp auch für die Vero-Zelllinie, die u.a. neben der MDCK-Zelllinie in der Influenzaimpfstoffproduktion verwendet wird sowie für eine humane Lungenepithelzelllinie bestätigt werden.

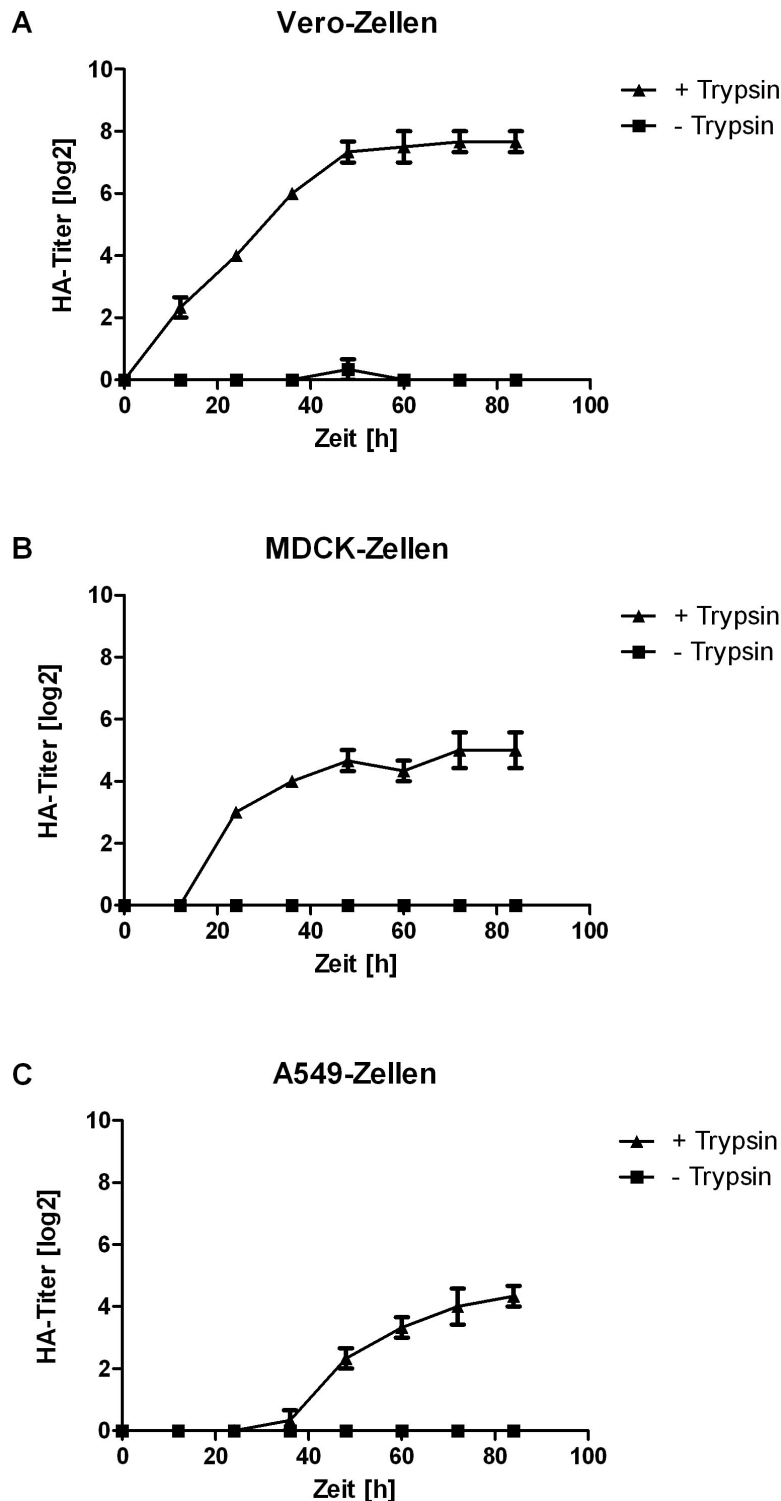


Abbildung 5-1 Trypsinabhängige Replikation des FPVmut in Vero-, A549- und MDCK-Zellen

(A) Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-2} (B) A549-Zellen und (C) MDCK jeweils mit einer MOI von 10^{-4} ohne (-) oder unter Zugabe (+) von 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin mit FPVmut infiziert. Bis zum Zeitpunkt 84 h nach Infektion wurde in 12 h Intervallen der HA-Titer des Zellüberstandes mit Hühnererythrozyten ermittelt. Die angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

5.1.2 Replikation des FPVmut und PR8 in den drei für die Impfstoffproduktion verwendeten Vermehrungssystemen

Zurzeit werden für die Impfstoffproduktion hauptsächlich drei unterschiedliche Anzüchtssysteme verwendet. Die meisten derzeit verwendeten Influenzaimpfstoffe werden in embryonierten Hühnereiern produziert. Dieses Vermehrungssystem wird zunehmend durch zellbasierte Anzüchtssysteme, wie z.B. Vero- oder MDCK-Zellen, komplementiert [63;83].

5.1.2.1 Virusausbeuten bei Anzucht in Hühnereiern

PR8 und FPVmut wurden sukzessive in embryonierten Hühnereiern passagiert. Im Anschluss wurde von jeweils fünf infizierten Eiern der 10. Passage der HA-Titer bestimmt und gemittelt. Dies diente als Messgröße für die gesamt gebildete Virusmenge inklusive der nicht infektiösen Viruspartikel. Die Mittelwerte lagen für FPVmut und PR8 bei $10,8 \pm 0,27 \log_2$ bzw. $11,5 \pm 0,5 \log_2$ (siehe Abbildung 5-2 A). Die jeweils erzielten maximalen Einzelwerte betrugen 2^{11} beim FPVmut und 2^{12} beim PR8. Zusätzlich wurde die Gesamtheit der infektiösen Einheiten pro ml (PFU/ml) aus vier infizierten Eiern ermittelt. PR8 erreichte einen Mittelwert von $1,26 \times 10^{10} \pm 5,20 \times 10^9$ und FPVmut von $1,28 \times 10^{10} \pm 9,91 \times 10^9$ (siehe Abbildung 5-2 B). Der höchste Einzelwert wurde hierbei mit FPVmut erzielt und betrug $2,72 \times 10^{10}$ PFU/ml im Vergleich zu $1,70 \times 10^{10}$ bei PR8. Somit konnte gezeigt werden, dass FPVmut im Hühnereier-System höhere maximale Ausbeuten an infektiösen Viren erzielen kann als PR8.

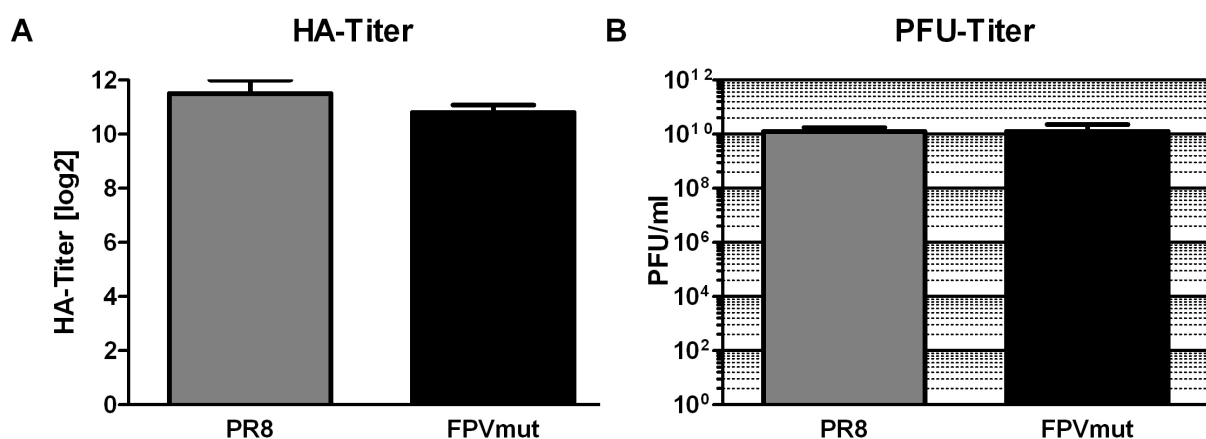


Abbildung 5-2 Virusausbeute des PR8 und FPVmut in Hühnereiern

Vergleich der Replikationseffizienz nach zehn Passagen in embryonierten Hühnereiern. (A) Für jeden Hintergrundstamm wurden die mit Hühnerythrozyten bestimmten HA-Titer aus fünf infizierten Hühnereiern gemittelt. (B) Aus vier infizierten Hühnereiern wurde die Anzahl infektiöser Partikel pro ml gemittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

5.1.2.2 Wachstumsverlauf in Vero- und MDCK-Zellen

Zunächst wurden die Viren durch sukzessive Passagen an die Vero-Zellen adaptiert:

- a) zwei Passagen mit einer Inokulum-Verdünnung von 10^{-2}
- b) eine Passage mit einer Inokulum-Verdünnung von 10^{-3}
- c) eine Passage mit einer Inokulum-Verdünnung von 10^{-4}

Zum Replikationsvergleich wurden die Vero-Zellen mit einer Virusverdünnung von 10^{-5} der letzten Passage infiziert. Die Virusausbeute wurde anhand des HA-Titers des Zellüberstandes nachgewiesen. PR8 und FPVmut zeichneten sich durch einen fast identischen Wachstumsverlauf aus, mit einem HA-Endtiter zum Zeitpunkt 72 h von 2^7 (siehe Abbildung 5-3 A). Bei mikroskopischer Betrachtung zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt alle Zellen lysiert waren (Daten nicht gezeigt).

Für den Vergleich des Wachstums in MDCK-Zellen wurden im Ei angezogene Viren verwendet und für die Infektion 10^5 infektiöse Einheiten eingesetzt. Zum Virusnachweis wurde ebenfalls der HA-Titer des Zellüberstandes ermittelt. Während bei den mit FPVmut infizierten Zellen bereits nach 24 Stunden ein HA-Titer und in der mikroskopischen Untersuchung ein zytopathischer Effekt zu verzeichnen war, zeigten die mit PR8 inokulierten Zellen zu diesem Zeitpunkt noch keine Infektionsanzeichen. Der HA-Endtiter betrug bei beiden Viren 2^7 (siehe Abbildung 5-3 B). FPVmut zeichnete sich somit im Vergleich zu PR8 durch einen früher nachweisbaren Infektionsbeginn in MDCK-Zellen aus, bei ansonsten identischen Replikationseigenschaften in Vero- und MDCK-Zellen.

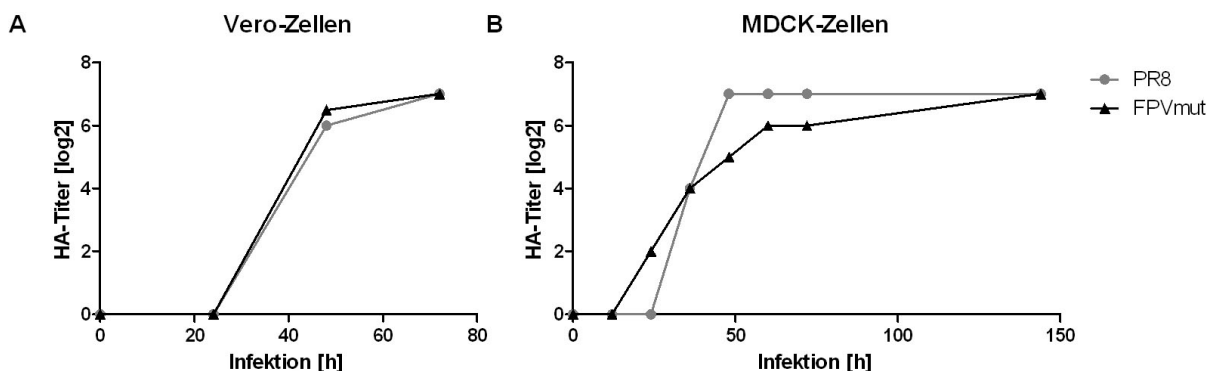


Abbildung 5-3 Replikationsvergleich zwischen FPVmut und PR8 in Vero- und MDCK-Zellen

Der Virusnachweis im Zellüberstand erfolgte mittels des HA-Tests für dessen Bestimmung Hühnererythrozyten verwendet wurden. (A) Infektion von Vero-Zellen mit einer Virusverdünnung von 10^{-5} . Die Virusmenge im Überstand wurde 24, 48 und 72 h nach Infektion ermittelt. (B) Infektion von MDCK-Zellen mit 10^5 infektiösen Einheiten. Der Zellüberstand wurde bis zum 72 h Zeitpunkt nach Infektion in 12 h Intervallen auf Virus überprüft. Abschließend wurde eine Messung nach 6 Tagen durchgeführt.

5.1.3 Schnellere lokale Infektionsausbreitung bei FPVmut im MDCK-Zellsystem

Der Plaque-Assay eignet sich, um die lokale Ausbreitung einer Infektion innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls optisch nachzuverfolgen. Hierfür wurden MDCK-Zellen nach der Infektion mit einem agarosehaltigen Medium überschichtet, welches die ungehinderte Ausbreitung der neu gebildeten Viren per Diffusion verhinderte. Die freigesetzten Viren konnten somit nur direkt benachbarte Zellen infizieren. MDCK-Zellen wurden parallel unter identischen Inkubationsbedingungen mit FPVmut und PR8 infiziert. Die Inokulum-Viren wurden zuvor in MDCK-Zellen oder embryonierten Hühnereiern vermehrt und anschließend eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-7} im Plaque-Assay eingesetzt (siehe 4.5.4). Zur Darstellung der räumlichen Ausbreitung der Infektion wurden jeweils die Verdünnungsstufen ausgewählt, bei denen die Abgrenzungen der einzelnen Plaques am besten erkennbar waren (siehe Abbildung 5-4). Innerhalb von drei Tagen waren die mit FPVmut erzielten Plaques deutlich größer als die mit den PR8-Viren. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit des FPVmut-Virus in den MDCK-Zellen ist somit höher als die des PR8-Virus.

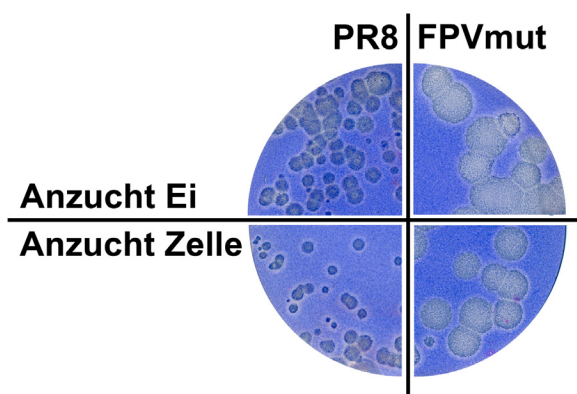


Abbildung 5-4 Plaque-Morphologie FPVmut und PR8 in MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden mit den beiden zu vergleichenden Hintergrundstämmen PR8 (links) und FPVmut (rechts) infiziert. Die Viren wurden entweder zuvor in embryonierten Hühnereiern angezogen (oben) oder in MDCK-Zellen vermehrt (unten). 72 h nach Infektion wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und gleichzeitig fixiert. Die durch das Virus zerstörten Zellbereiche blieben dabei ungefärbt. Maßstab: d=35 mm.

Diese Ergebnisse belegen, dass das FPVmut-Virus wesentliche für die Verwendung als Impfstoffsaatvirus erforderliche Wachstumscharakteristiken erfüllt. Neben dem bereits zuvor beschriebenen niedrigpathogenen Verhalten in MDCK-Zellen konnte dieser Phänotyp auch in der ebenfalls für die Impfstoffproduktion eingesetzten Vero-Zelllinie sowie zusätzlich in einer humanen Lungenepithelzelllinie nachgewiesen werden (siehe 5.1.1). Bei Anzucht im Hühnerei erzielte FPVmut z.T. höhere maximale Ausbeuten im Vergleich mit dem standardmäßig verwendeten PR8-Isolat (siehe 5.1.2.1). Außerdem zeichnete sich FPVmut gegenüber PR8 bei der Vermehrung in der Zellkultur (siehe 5.1.2.2) durch eine identisch verlaufende Replikation in Vero-Zellen und einen Replikationsvorteil in MDCK-Zellen aus. Letzteres konnte anhand zweier unterschiedlicher Beobachtungen festgestellt werden: Zum einen konnte Virus bereits zu früheren Zeitpunkten nach der Infektion im Zellüberstand

nachgewiesen werden und zum anderen war FPVmut durch eine höhere Ausbreitungsgeschwindigkeit gekennzeichnet (siehe 5.1.3).

5.2 Erzeugung rekombinanter Influenzaviren in beiden viralen Hintergrundstämmen

Die beiden zu vergleichende Hintergrundstämmen PR8 und FPVmut wurden zur Herstellung rekombinanter Viren eingesetzt (Bezeichnung je nach Akzeptorstamm: x PR8 oder entsprechend x FPVmut). Unter Einsatz ausgewählter Donorviren wurden Doppel-Reassortanten (2:6) mit den beiden Oberflächenproteine HA und NA sowie Triple-Reassortanten (3:5), die zusätzlich das isolatspezifische M-Segment des Donorvirus trugen, hergestellt.

Als Donorviren wurden pandemische, humane H1N1pdm09- („Schweinegrippe“), sowie potenziell pandemische, aviäre H5N1- („Vogelgrippe“) und H9N2-Viren verwendet. Zusätzlich wurden humane H1N1- und H3N2-Vakzinestämme der nördlichen Hemisphäre der Saison 2006/07 eingesetzt. Die Isolat-Bezeichnungen befinden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Isolat-Bezeichnungen der verwendeten Donorviren

Subtyp	Isolat
H1N1pdm09	HA und NA aus A/California/07/2009; M aus A/Hamburg/05/2009
H5N1	Attenuierte Variante des A/Vietnam/1194/2004
H9N2	A/Huhn/Beijing/2/1997
H1N1	A/Solomon Islands/3/2006
H3N2	A/Wisconsin/67/2005

5.2.1 Herstellung der Influenza-Reassortanten

Für die Erzeugung der zur Herstellung der rekombinanten Influenzaviren benötigten Plasmide mussten von allen verwendeten Isolaten die HA-, NA- und M-Gensegmente in voller Länge mittels RT-PCR amplifiziert werden. Hierfür wurden im ersten Schritt der RT-PCR durch Wahl eines Primers, der komplementär zu den zwölf konservierten Nukleotiden am 3'-Segmentende ist [28], parallel alle viralen RNAs in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt wurden unter Berücksichtigung der segmentspezifischen Bereiche die jeweils gewünschten Gensegmente amplifiziert. Exemplarisch sind in Abbildung 5-5 die so generierten und gereinigten Gensegmente des H9N2-Isolates dargestellt.

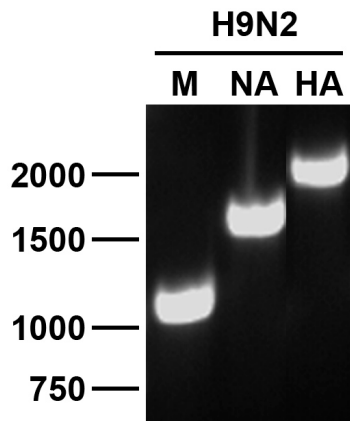


Abbildung 5-5 Amplifizierte M-, NA- und HA-Gensegmente des H9N2-Isolates

Die Gensegmente wurden in einer 2-Schritt RT-PCR zunächst mit einem Primer gegen die zwölf konservierten Nukleotiden des Segmentendes und im zweiten Schritt mit segmentspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Anschließend wurden sie über eine Gelpräparation gereinigt und zusammen mit dem GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse für das H9N2-Isolat. Die Segmente besitzen folgende Längen: das M-Segment ist 1027 bp, das NA 1458 bp und das HA 1742 bp lang.

Die isolierten und gereinigten Gensegmente wurden über BsmBI-Restriktion in den pHW2000 Vektor einkloniert, der zur Erzeugung rekombinanter Influenzaviren entwickelt wurde [79]. Zur ersten Überprüfung der erhaltenen Konstrukte wurde ein analytischer Restriktionsverdau (siehe 8.2) durchgeführt. Anschließend wurden die Übergänge zum Plasmid sowie die gesamte Gensequenz verifiziert. Die so generierten Vektoren fanden dann zur Erzeugung rekombinanter Viren nach der von Neumann *et al.* [77] beschriebenen Methode Anwendung. Hierbei wurden acht für die Gensegmente kodierende pHW2000 Plasmide parallel in humane 293T-Zellen transfiziert. In der Folge begannen die Zellen Viruspartikel zu synthetisieren und diese in den Zellüberstand abzugeben. Mit diesem Zellüberstand wurden im nächsten Schritt MDCK-Zellen zur Virusvermehrung infiziert und abschließend zur Erzeugung klonaler Virusisolate drei Plaque-Passagen durchgeführt. Insgesamt wurde ein Panel von 18 unterschiedlichen rekombinanten Influenzaviren (siehe Tabelle 4) erzeugt. Das Plasmid-System (siehe Kapitel 8.2) für den FPMut-Akzeptorstamm wurde freundlicherweise von Dr. Ralf Wagner [83;152] und das für den PR8-Akzeptorstamm von Prof. George Brownlee zur Verfügung gestellt [146].

In beiden Akzeptorstämmen konnten, bis auf die 3:5 Reassortante des saisonalen H1N1-Isolates, alle gewünschten rekombinanten Viren erzeugt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ließ sich nicht klären, warum die Triple-Reassortante mit dem saisonalen H1N1-Virus nicht generiert werden konnte. Anhand der klonierten M-Sequenz konnte kein Hinweis für eine mögliche Ursache gefunden werden. Die Sequenz weist, außer einer stillen Mutation in der zweiten Aminosäure, keine Veränderung zu der bei NCBI publizierten Sequenz auf (Accession Nr. CY031341). Das M-Gensegment kodiert neben dem M1- auch das M2-Protein, für welches nach der Transkription die mRNA gespleißt werden muss. Der stattgefunden Basenaustausch befindet sich nicht in einem Bereich der Exon-Intron

Übergänge, wodurch auch eine Beeinträchtigung des Spleißvorgangs und der Bildung des M2-Proteins als Ursache nahezu ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 4: Übersicht der generierten rekombinanten Influenzaviren

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aller hergestellten rekombinanten Influenzaviren. Dabei sind entweder Doppel-Reassortanten generiert worden, bei denen die beiden Oberflächenproteine HA und NA aus dem Donorvirus mit den restlichen Segmenten der beiden Akzeptorstämmen kombiniert wurden (linke Spalte) oder Triple-Reassortanten, bei denen zusätzlich zu den Oberflächenproteinen das korrespondierende M-Segment eingebracht wurde (rechte Spalte).
+ = Reassortante verfügbar, - = Reassortante nicht vorhanden

pandemisches Isolat		
Akzeptor	Donor	H1N1pdm09 = HA+NA aus A/California/07/2009 + M aus A/Hamburg/05/2009
		HA+NA HA+NA+M
PR8		+
FPV		+
potenziell pandemische Isolate		
Akzeptor	Donor	H5N1 = attenuierte Variante A/Vietnam/1194/2004
		HA+NA HA+NA+M
PR8		+
FPV		+
Akzeptor	Donor	H9N2 = A/Huhn/Beijing/2/1997
		HA+NA HA+NA+M
PR8		+
FPV		+
saisonale Isolate		
Akzeptor	Donor	H1N1 = A/Solomon Islands/3/2006
		HA+NA HA+NA+M
PR8		+
FPV		-
Akzeptor	Donor	H3N2 = A/Wisconsin/67/2005
		HA+NA HA+NA+M
PR8		+
FPV		+

5.2.2 Identitätsprüfung aller generierten rekombinanten Influenzaviren

Das Reverse-Genetik-System ermöglicht es im Gegensatz zum klassischen Reassortment, ausschließlich Viren mit einer definierten genetischen Zusammensetzung zu produzieren. Dadurch entfällt eine anschließende notwendige Selektion, z.B. mittels Antiserum. Dennoch muss natürlich der korrekte Genotyp der erzeugten Viren bestätigt werden. Zum Nachweis und zur Sicherstellung der Identität der generierten Influenzaviren wurde daher eine isolatspezifische RT-PCR etabliert.

Für jedes verwendete Influenzaisolat wurden individuelle Primerpaare entwickelt, die für die einzelnen HA- und NA-Gensegmente isolatspezifisch sind. Der Identitätsnachweis der Viren erfolgte über die Amplifikation spezifischer Genfragmente mit einer Größe zwischen 279-364 bp für das HA und 310-495 bp für das NA (siehe 8.1). Zusätzlich wurden zur Bestätigung des Akzeptorstammes Primer für das NP entwickelt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von 87-93 % der M-Gensegmente wurden diese zur Identifizierung amplifiziert und in Teilen sequenziert.

Die Tauglichkeit dieser entwickelten Primer zur isolat- und segmentspezifischen Amplifikation wurde unter Verwendung der pHW2000 Plasmide überprüft. Zum Ausschluss einer möglichen Kreuzreaktivität zwischen den Primern und einem anderen Virusisolat wurden mit jedem Primerpaar PCRs durchgeführt, in denen einzeln alle Plasmide des zu untersuchenden Gensegmentes aller unterschiedlichen Isolate als Template eingesetzt wurden. Die Isolatspezifität der verwendeten Oligonukleotide wurde hiermit verifiziert und die Primerpaare konnten nachweislich auch zwischen den unterschiedlichen Isolaten des H1N1-Subtyps diskriminieren.

In Abbildung 5-6 sind die Spezifitätsnachweise der für das H9N2-Isolat verwendeten NA- (A) bzw. HA-Primerpaare (B) exemplarisch dargestellt. In Abbildung 5-6 C ist der Spezifitätsnachweis der NP-Primer der Akzeptorstämme gezeigt.

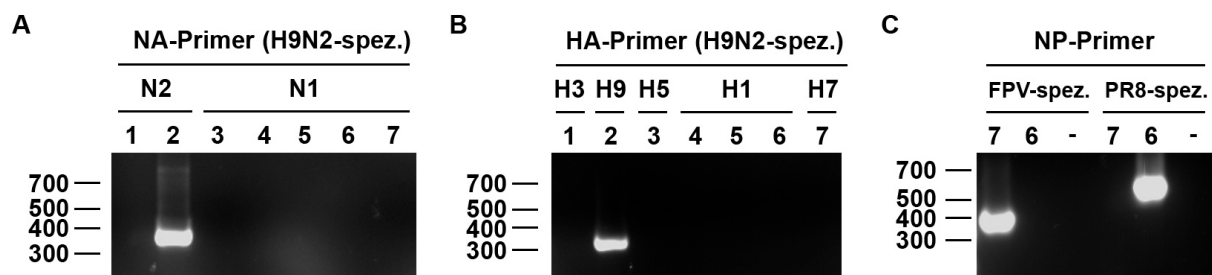


Abbildung 5-6 Nachweis der Isolatspezifität der Genotypisierungsprimer exemplarisch für die H9N2-Primer sowie der Akzeptorstamm spezifischen NP-Primer

Die Isolatspezifität der Genotypisierungsprimer wurde anhand der Plasmide zur Herstellung der rekombinanten Influenzaviren ausgetestet. Es gilt 1 = H3N2, 2 = H9N2, 3 = H5N1, 4 = H1N1, 5 = H1N1pdm09, 6 = H1N1/PR8 und 7 = H7N1 (A) Das 316 bp Fragment zum Nachweis des H9N2-NA-Gensegments konnte nur bei Bereitstellung der H9N2-NA-Gensequenz amplifiziert werden. (B) Entsprechendes gilt für das 305 bp Amplifikat der H9N2 isolatspezifischen HA-Primer. (C) Der Nachweis der Akzeptorstämme erfolgte über das NP-Gen. Die Primerpaare konnten nur bei Verfügbarkeit ihres zugehörigen NP-Templates ein Fragment amplifizieren. Dieses ist bei den FPVmut (H7N1) spezifischen Oligonukleotiden 337 bp lang (links), bei dem PR8 (H1N1) 466 bp (rechts). Zusätzlich wurde hier eine Wasserkontrolle ohne DNA mitgeführt (-). Die Auftrennung erfolgt zusammen mit dem GeneRuler Low Range DNA Ladder (Fermentas) bei A und B in einem 3 %, bei C in einem 2 % Agarosegel.

Zur Überprüfung der genetischen Identität und isolatspezifischen Reinheit der hergestellten rekombinanten Influenzaviren wurde RNA isoliert und mittels einer RT-PCR unter Verwendung der zuvor beschriebenen isolatspezifischen Genotypisierungsprimer die Gensegment-Zusammensetzung kontrolliert. Im Falle einer Kontamination mit einem anderen Virus würde man nicht nur bei den für das entsprechende Isolat spezifischen Primerpaaren ein Amplifikat erhalten, sondern zusätzlich bei jenen, die spezifisch ein potenzielles Kontaminationsisolat erkennen. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse für die Überprüfung des HA der Doppel-Reassortanten des H9N2-Isolates in beiden Hintergrundstämmen (siehe Abbildung 5-7). Es zeigte sich, dass alle erzeugten Viren die festgelegte genetische Zusammensetzung besaßen und keine Kontamination mit einem anderen Isolat vorlag.

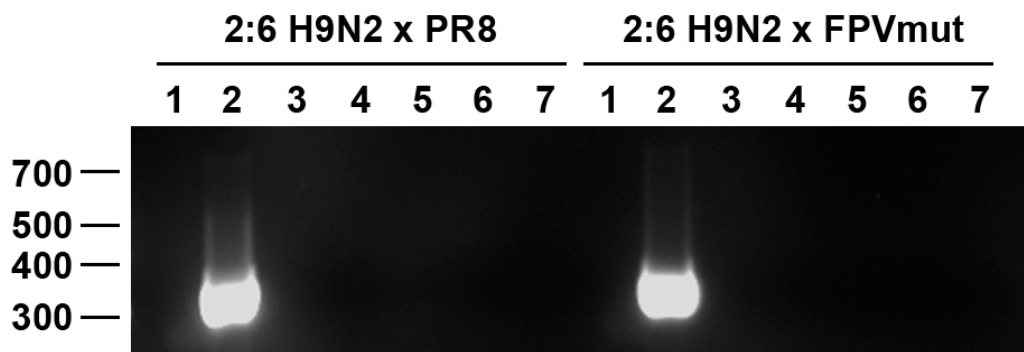


Abbildung 5-7 HA Genotypisierung der H9N2-Doppel-Reassortanten

Nach 10 Passagen in embryonierten Hühnereiern wurde RNA von je 750 µl Allantoisflüssigkeit zweier unterschiedlicher Eiern präpariert, gepoolt und für alle unterschiedlichen isolatspezifischen HA-Primer eine einzelne RT-PCR durchgeführt. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse für die H9N2-Doppel-Reassortanten in beiden Hintergrundstämmen (PR8 links und FPVmut rechts). Eingesetzt wurden folgenden HA-Primer, die isolatspezifisch für 1 = H3N2, 2 = H9N2, 3 = H5N1, 4 = H1N1, 5 = H1N1pdm09, 6 = H1N1/PR8 und 7 = H7N1 waren. Das erwartete HA Fragment besitzt eine Größe von 305 bp und wurde in einem 3 % Agarosegel zusammen mit dem GeneRuler Low Range DNA Ladder (Fermentas) aufgetrennt.

5.3 Charakterisierung der Replikationseffizienz der rekombinanten Influenzaviren

Im Kapitel 5.1 wurden die positiven Replikationseigenschaften des FPVmut-Akzeptorstammes in unterschiedlichen Vermehrungssystemen gezeigt. Die nachfolgenden Kapitel beschäftigen sich mit dem Vergleich der beiden unterschiedlichen Akzeptorstämme anhand der durchgeführten Replikationsuntersuchungen der generierten rekombinanten Influenzaviren.

5.3.1 Früher nachweisbarer Infektionsbeginn in MDCK-Zellen bei FPVmut-Reassortanten

Das Replikationsverhalten aller hergestellten rekombinanten Influenzaviren wurde in MDCK-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit einer MOI von 10^{-3} mit allen Reassortanten parallel infiziert und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Virusreplikation anhand des mit Meerschweinchenerythrozyten ermittelten HA-Titers über einen Zeitraum von drei Tagen in 12 h-Intervallen verfolgt.

Für den ersten Replikationsvergleich wurden die zur Inokulation verwendeten Viren vor dem Infektionsexperiment in MDCK-Zellen vermehrt. Auffällig ist hierbei der Wachstumsvorteil der FPVmut-Reassortanten zu den frühen Zeitpunkten nach der Infektion (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Replikationsvergleich der rekombinanten Influenzaviren im MDCK-Zellsystem nach vorheriger Virusvermehrung in MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden parallel mit einer MOI von 10^{-3} mit allen zuvor in MDCK-Zellen vermehrten rekombinanten Influenzaviren infiziert, wobei 2:6 für die Doppel- und 3:5 für die Triple-Reassortanten steht. Über einen Zeitraum von 72 h nach der Infektion (p.i.) wurde der HA-Titer [log2] des Zellüberstands mit Meerschweinchenerythrozyten ermittelt und die Werte in der Tabelle aufgeführt. Die Ergebnisse für die FPVmut-Reassortanten (vor dem Schrägstrich) wurden den PR8-Viren (nach dem Schrägstrich) gegenüber gestellt. Farblich unterlegte Felder kennzeichnen die Zeitpunkte, zu denen der HA-Titer der FPVmut-Reassortanten höher (rot), identisch (orange) und niedriger (gelb) als die der PR8-Reassortanten war.

Donorvirus	Reassortante	HA-Titer: FPVmut/PR8 [log2]						
		Zeit p. i. [h]						
		0	12	24	36	48	60	72
H1N1pdm09	2:6	0/0	2/0	5/4	5/6	5/7	6/7	6/7
	3:5	0/0	0/0	4/0	5/4	5/5	6/5	6/5
H5N1	2:6	0/0	0/0	5/0	6/5	6/7	6/7	6/7
	3:5	0/0	0/0	3/0	5/2	5/6	5/6	5/7
H9N2	2:6	0/0	2/0	4/0	4/7	4/8	4/8	4/8
	3:5	0/0	2/0	5/0	5/4	5/6	5/6	5/7
H3N2	2:6	0/0	0/0	4/3	5/6	5/8	5/8	5/8
	3:5	0/0	0/0	3/0	4/4	4/6	4/6	4/6
H1N1	2:6	0/0	1/0	6/5	7/7	7/8	7/8	7/8

Es konnte bereits nach 12 Stunden Inkubation bei den H9N2, H1N1 und den Doppel-Reassortanten des H1N1pdm09-Isolates Virus im Zellüberstand nachgewiesen werden. Zu diesen frühen Zeitpunkten waren weder mikroskopisch (Daten nicht gezeigt) noch über den HA-Test bei den entsprechenden PR8-Reassortanten Anzeichen einer Infektion erkennbar. Zwölf Stunden später war der HA-Titer bei allen FPVmut-Reassortanten höher als bei den PR8-Viren, bei denen z.T. noch kein Virus nachgewiesen werden konnte. Für alle Viren, mit

Ausnahme der H1N1pdm09-Triple-Reassortante, wurden dann erstmals nach 48 Stunden im PR8-Hintergrund höhere HA-Titer gemessen.

Ergänzend zu den in der Zellkultur vermehrten Viren wurden auch zuvor in embryonierten Hühnereiern angezogene Viren auf ihr Replikationsverhalten in MDCK-Zellen untersucht (siehe Tabelle 6). Hier konnte ebenfalls der Replikationsvorteil der FPVmut-Reassortanten gegenüber den PR8-Reassortanten zu den frühen Infektionszeitpunkten gezeigt werden. 24 h nach Infektionsbeginn konnte Virus fast ausschließlich bei den FPVmut-Reassortanten nachgewiesen werden. In den beiden Fällen, in denen auch beim PR8-Hintergrund eine Virusreplikation detektiert wurde, war hier der HA-Titer deutlich niedriger. Zwölf Stunden später waren nur die mit den FPVmut-Triple-Reassortanten der aviären Isolate erzielten Ausbeuten höher als die der PR8-Viren. Ab dem 48 Stunden Zeitpunkt waren in den meisten Fällen die Werte der HA-Titer der PR8-Reassortanten höher.

Tabelle 6: Replikationsvergleich der rekombinanten Influenzaviren im MDCK-Zellsystem nach vorheriger Virusvermehrung in embryonierten Hühnereiern

MDCK-Zellen wurden parallel mit einer MOI von 10^{-3} mit allen zuvor in embryonierten Hühnereiern vermehrten rekombinanten Influenzaviren infiziert. Für eine detailliertere Beschreibung siehe Tabellenlegende bei Tabelle 5.

Donorvirus	Reassortante	HA-Titer: FPVmut/PR8 [log2]						
		Zeit p. i. [h]						
		0	12	24	36	48	60	72
H1N1pdm09	2:6	0/0	0/0	5/0	5/6	6/8	6/8	6/8
	3:5	0/0	0/0	4/0	5/5	6/6	6/6	6/6
H5N1	2:6	0/0	0/0	5/0	5/6	6/7	6/7	6/7
	3:5	0/0	0/0	4/0	5/4	5/6	5/6	6/6
H9N2	2:6	0/0	0/0	5/3	6/9	6/9	6/9	6/9
	3:5	0/0	0/0	5/0	5/4	6/6	6/7	6/7
H3N2	2:6	0/0	0/0	4/0	5/6	6/8	6/8	6/8
	3:5	0/0	0/0	0/0	4/4	5/6	5/7	5/7
H1N1	2:6	0/0	0/0	7/5	7/7	7/7	7/7	7/7

Bereits im Kapitel 5.1.2.2 wurde gezeigt, dass sich das FPVmut-Akzeptorstammvirus in MDCK-Zellen durch einen Replikationsvorteil gegenüber dem PR8-Isolat zu frühen Infektionszeitpunkten auszeichnet. Dieses Phänomen konnte auch bei den FPVmut-Reassortanten beobachtet werden.

5.3.2 Beschleunigte Infektionsausbreitung in MDCK-Zellen bei aviären Isolaten im FPVmut-Hintergrund

Die effizientere Ausbreitung des FPVmut-Akzeptorvirus wurde bereits im Kapitel 5.1.3 beschrieben. In diesem Kapitel werden die Untersuchungen zur Ausbreitungsgeschwindigkeit der rekombinanten Influenzaviren dargestellt. Für alle hier gezeigten Plaque-Assays wurden die Infektionen der MDCK-Zellen parallel durchgeführt, um exakt identische Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und die zerstörten Bereiche durch Kristallviolettffärbung der noch lebenden Zellen sichtbar gemacht. Zum Vergleich wurden sowohl im Hühnerei als auch in MDCK-Zellkultur vermehrte Viren als Inokulum eingesetzt.

Ausbreitungsgeschwindigkeit der Reassortanten des H5N1-Subtyps:

Die H5N1-Triple-Reassortanten sind den PR8-Reassortanten in ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit überlegen, unabhängig von dem zuvor zur Vermehrung eingesetzten Kultursystem (siehe Abbildung 5-8). Dieser Replikationsvorteil zeigte sich auch bei den in MDCK-Zellen vermehrten FPVmut-Doppel-Reassortanten, wohingegen die Plaquegrößen nach Anzucht im Hühnerei bei beiden Hintergrundstämmen sehr ähnlich waren.

Das Einbringen der H5N1-Oberflächenproteine in den PR8-Hintergrund induzierte somit eine deutlich gesteigerte Infektionsausbreitung, veränderte aber nicht die Ausbreitungskinetik der FPVmut-Viren (vergleiche Abbildung 5-8 mit Abbildung 5-4, beide Versuche parallel durchgeführt)

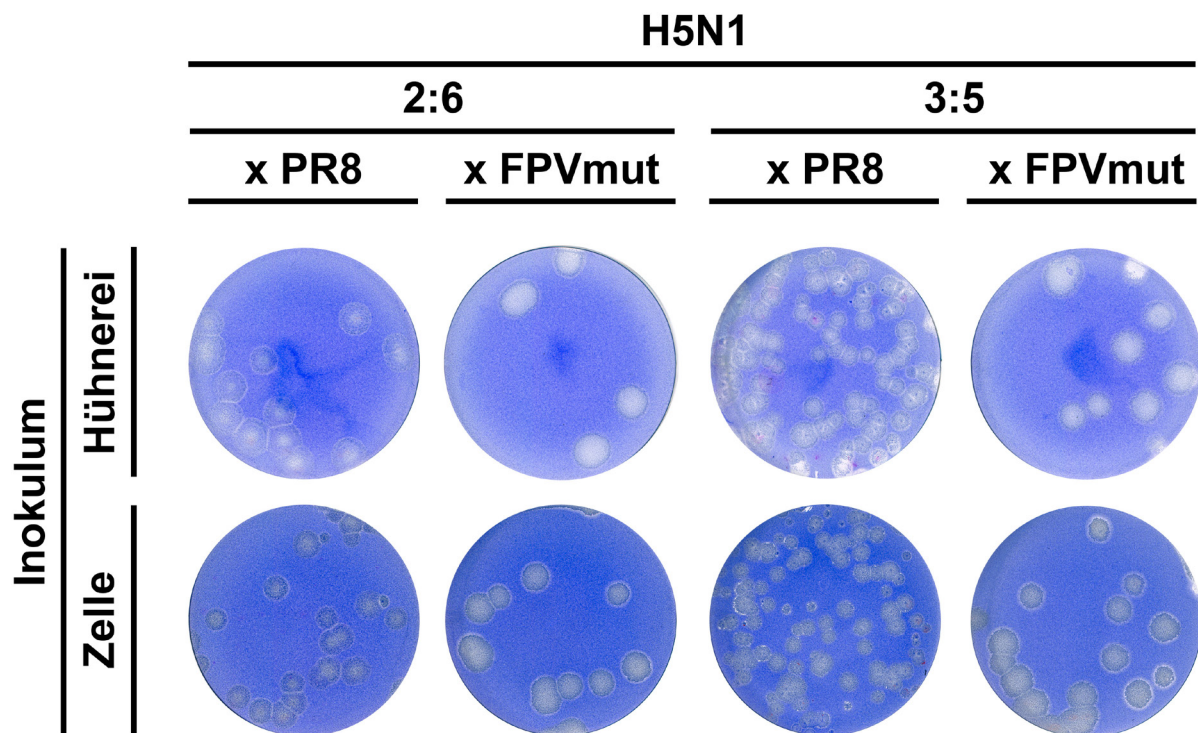


Abbildung 5-8 Infektionsausbreitung der H5N1-Reassortanten in MDCK-Zellen

Dargestellt sind die Plaquegrößen nach 72-stündiger Inkubation der unterschiedlichen H5N1 Reassortanten in MDCK-Zellen. Die Inokulum Viren wurden zuvor im Hühnerei (obere Reihe) oder auf MDCK-Zellen (untere Reihe) vermehrt. Auf der linken Seite befinden sich die Doppel-Reassortanten (2:6) und auf der rechten Seite die Triple-Reassortanten (3:5). Durch das verwendete agarosehaltige Medium konnten die neu freigesetzten Viren nur direkt benachbarte Zellen infizieren und die zeitlich abhängige, räumliche Ausbreitung der Infektion wurde mittels Kristallviolettffärbung visualisiert. Maßstab: d=35 mm.

Ausbreitungsgeschwindigkeit der Reassortanten des H9N2-Subtyps:

Die in den H5N1-Triple-Reassortanten beobachtete gesteigerte Infektionsausbreitung bei Verwendung des FPVmut-Hintergrundstammes im Vergleich zum PR8-Akzeptor konnte auch in den H9N2-Doppel-Reassortanten beobachtet werden (siehe Abbildung 5-9), wobei die Ausbreitungsgeschwindigkeit der zuvor in MDCK-Zellen vermehrten Viren insgesamt etwas geringer war als die der im Hühnerei angezogenen Viren. Die FPVmut-Triple-Reassortanten waren im Vergleich zu den Doppel-Reassortanten durch eine eingeschränkere Infektionsausbreitung gekennzeichnet, wobei die erzielten Plaquegrößen in etwa jenen der mit den PR8-Triple-Reassortanten erhaltenen Plaques entsprachen.

Das Einbringen der Oberflächenproteine des H9N2-Isolats bewirkte also beim FPVmut eine starke Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, blieb jedoch beim PR8 ohne Einfluss (vergleiche Abbildung 5-9 mit Abbildung 5-4).

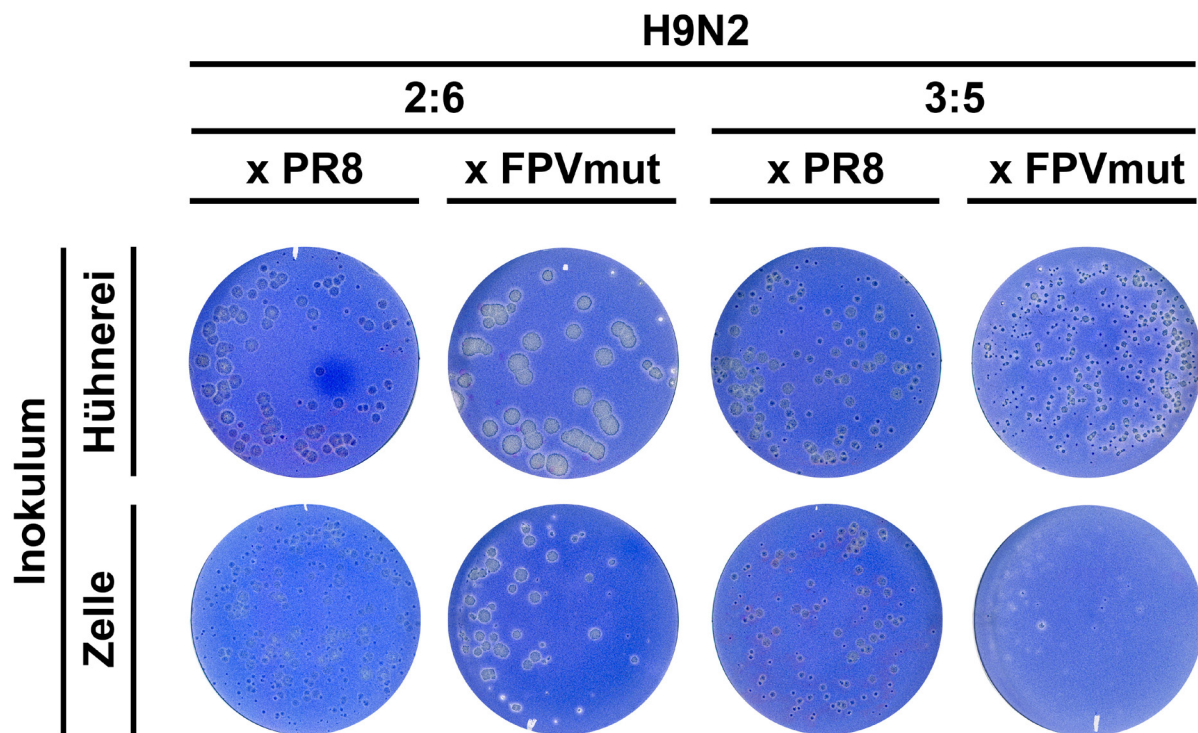


Abbildung 5-9 Infektionsausbreitung der H9N2-Reassortanten in MDCK-Zellen

Dargestellt sind die Plaquegrößen der unterschiedlichen H9N2-Reassortanten in MDCK-Zellen nach Anzucht im Ei-System (obere Reihe) oder auf MDCK-Zellen (untere Reihe) nach 72-stündiger Inkubation. Auf der linken Seite befinden sich die Doppel-Reassortanten (2:6) und auf der rechten Seite die Triple-Reassortanten (3:5). Für weitere Angaben siehe Details in der Bildlegende bei Abbildung 5-8.

Ausbreitungsgeschwindigkeit der Reassortanten des H1N1pdm09-Subtyps:

Alle ausgehend vom H1N1pdm09-Isolat generierten Viren waren unabhängig vom Hintergrundstamm, von der genetischen Zusammensetzung und dem zur Anzucht verwendeten System durch eine sehr stark eingeschränkte Infektionsausbreitung charakterisiert (siehe Abbildung 5-10).

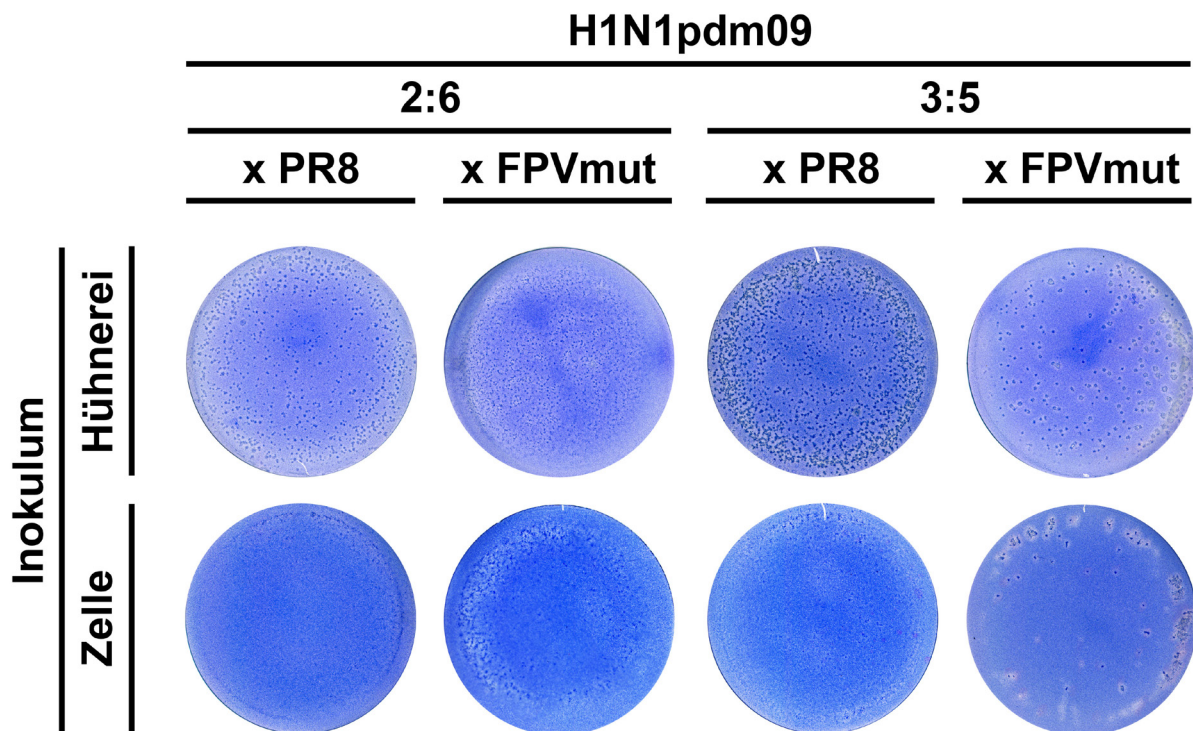


Abbildung 5-10 Infektionsausbreitung der H1N1pdm09-Reassortanten in MDCK-Zellen

Dargestellt sind die Plaquegrößen der unterschiedlichen H1N1pdm09-Reassortanten in MDCK-Zellen nach Anzucht im Ei-System (obere Reihe) oder auf MDCK-Zellen (untere Reihe) nach 72-stündiger Inkubation. Auf der linken Seite befinden sich die Doppel-Reassortanten (2:6) und auf der rechten Seite die Triple-Reassortanten (3:5). Für weitere Angaben siehe Details in der Bildlegende bei Abbildung 5-8.

Ausbreitungsgeschwindigkeit der Reassortanten des H3N2-Subtyps:

Bei den erzeugten rekombinanten Viren des humanen H3N2-Subtyps zeigten die Triple-Reassortanten generell eine etwas verminderte Ausbreitungsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Doppel-Reassortanten (siehe Abbildung 5-11). Hierbei wiesen in beiden genetischen Konstellationen die PR8-Reassortanten einen minimalen Replikationsvorteil gegenüber den FPVmut-Reassortanten auf. Diese Feststellungen gelten unabhängig von dem vorher zur Anzucht des Inokulums eingesetzten Vermehrungssystem.

Der Austausch der Oberflächenproteine gegen die H3N2-Proteine beeinflusste die Ausbreitungsgeschwindigkeit im PR8 nicht, übte jedoch einen hemmenden Einfluss auf FPVmut aus (vergleiche Abbildung 5-11 mit Abbildung 5-4).

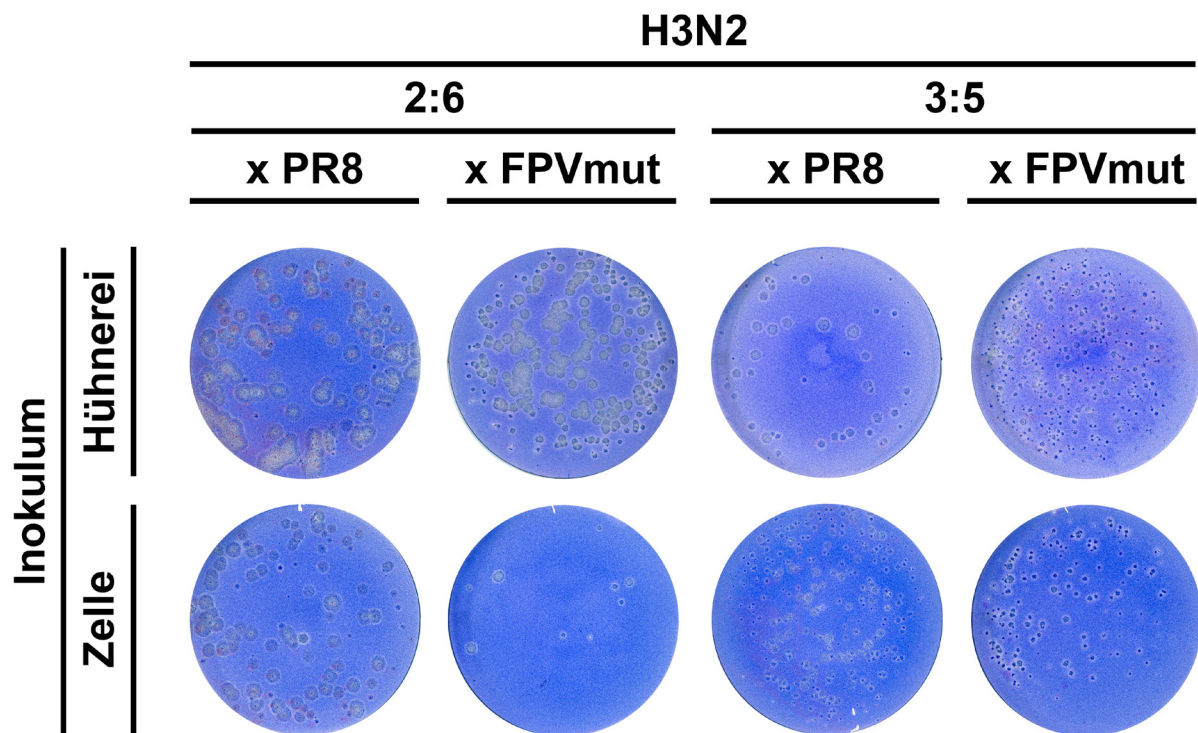


Abbildung 5-11 Infektionsausbreitung der H3N2-Reassortanten in MDCK-Zellen

Dargestellt sind die Plaquegrößen der unterschiedlichen H3N2-Reassortanten in MDCK-Zellen nach Anzucht im Ei-System (obere Reihe) oder auf MDCK-Zellen (untere Reihe) nach 72-stündiger Inkubation. Auf der linken Seite befinden sich die Doppel-Reassortanten (2:6) und auf der rechten Seite die Triple-Reassortanten (3:5). Für weitere Angaben siehe Details in der Bildlegende bei Abbildung 5-8.

Ausbreitungsgeschwindigkeit der Reassortanten des H1N1-Subtyps:

Für die Reassortanten des humanen H1N1-Isolates zeigte sich ein minimaler Vorteil in der Infektionsausbreitungsgeschwindigkeit bei Verwendung des PR8-Hintergrundstammes (siehe Abbildung 5-12).

Wie auch beim H9N2-Isolat beobachtet, bewirkte der Austausch der Oberflächenproteine beim FPVmut eine starke Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, nahm hingegen beim PR8 keinen Einfluss (vergleiche Abbildung 5-12 mit Abbildung 5-4).

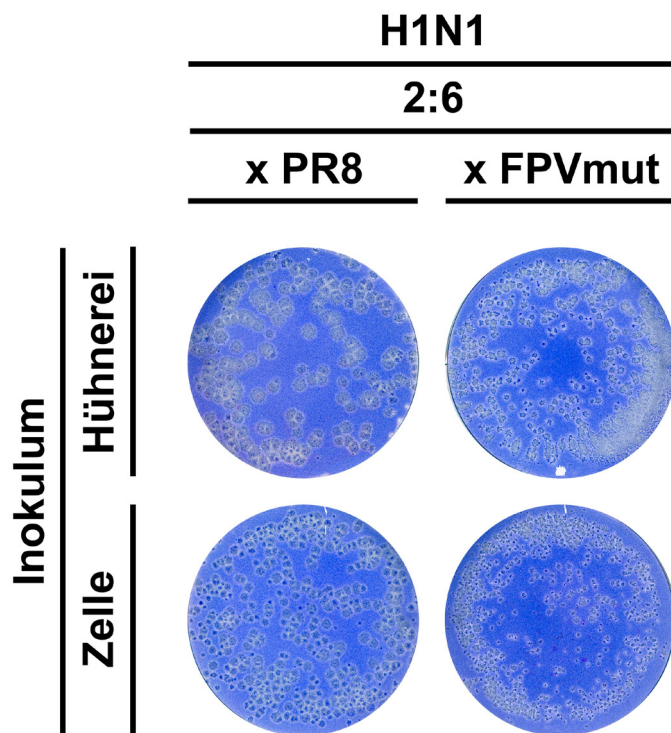


Abbildung 5-12 Infektionsausbreitung der H1N1-Reassortanten in MDCK-Zellen

Dargestellt sind die Plaquegrößen der unterschiedlichen H1N1-Reassortanten in MDCK-Zellen nach Anzucht im Ei-System (obere Reihe) oder auf MDCK-Zellen (untere Reihe) nach 72-stündiger Inkubation. Für weitere Angaben siehe Details in der Bildunterschrift bei Abbildung 5-8.

Bei der Verwendung saisonaler humaner Donorviren zeigte sich somit, dass die im humanen PR8-Hintergrundstamm generierten rekombinanten Viren im Vergleich zum aviären FPVmut-Akzeptorstamm durch eine höhere Ausbreitungsgeschwindigkeit gekennzeichnet waren. Im Gegensatz hierzu wirkte sich die Verwendung des aviären FPVmut als Akzeptorstamm positiv auf die Infektionsausbreitung nach Reassortierung mit aviären Isolaten aus. Dieser positive Effekt zeigte sich insbesondere für das potenziell pandemische H5N1-Isolat und bei den Doppel-Reassortanten des H9N2-Virus. Für das pandemische H1N1pdm09-Isolat konnte, bei einer insgesamt sehr eingeschränkten Ausbreitung, die effizienteste Ausbreitung mit den FPVmut-Triple-Reassortanten beobachtet werden.

5.4 Analyse der Antigenausbeuten der rekombinanten Influenzaviren

Um eine umfassende Impfstoffversorgung gewährleisten zu können, muss eine ausreichende Menge an Impfantigen zeitnah unter wirtschaftlich rentablen Produktionsbedingungen hergestellt werden. Eine optimale Antigenausbeute, insbesondere im Pandemie-Fall, ermöglicht eine schnellere Verfügbarkeit einer größeren Menge an Impfdosen, wodurch der Schutz weiter Teile der Bevölkerung sichergestellt werden kann. Die

HA-Antigenausbeute korreliert hierbei direkt mit der Anzahl produzierbarer Impfstoffdosen, da alle inaktivierten Influenza-Vakzinen auf einen bestimmten HA-Zielgehalt hin formuliert werden.

Im Herstellungsprozess werden die Impfstoffsaatviren durch mehrfache Passagen an das verwendete Vermehrungssystem adaptiert, bevor die eigentliche Impfstoffproduktion beginnt. Prinzipiell können zur Bewertung der Eignung bestimmter viraler Hintergrundstämme zur Erzielung hoher Antigenausbeuten in Anzuchtssystemen zwei Kriterien herangezogen werden:

- a) die maximale Ausbeute
(als Indikator der absoluten Leistungsfähigkeit des Systems)
- b) die gemittelte Ausbeute
(diese spiegelt eine produktionsrelevantere Betrachtungsweise wieder, da alle Ansätze in der Impfstoffherstellung verwendet werden)

5.4.1 Untersuchungen zur Auswirkung der Hintergrundstämme auf den HA-Gehalt

Die in einer Viruspräparation enthaltende HA-Antigenmenge kann auf unterschiedliche Weisen ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung des HA-Gehalts der hergestellten rekombinanten Viren folgende Methoden verwendet:

- a) HA-Titer (grobe Quantifizierung)
- b) Westernblot-Analysen
- c) Einfacher radialer Immundiffusionstest (SRID)

5.4.1.1 Höhere HA-Titer der H5N1-FPVmut-Reassortanten im Hühnerei

Zur Überprüfung der Replikationskapazitäten der rekombinanten Viren im Hühnerei wurde zunächst der PFU-Titer bestimmt, der eine Aussage zur Anzahl der infektiösen, vermehrungsfähigen Virus-Einheiten macht. Dieser lässt jedoch keinen Rückschluss auf die Gesamtheit aller gebildeten viralen Partikel zu, worunter sich auch defekte, keine Infektion initiiierende Virionen befinden, die im realen Produktionsprozess zur Antigenausbeute beitragen können. Diese nicht infektiösen Einheiten können im zusätzlich durchgeführten HA-Test mit erfasst werden.

Für diese Untersuchungen wurden die Doppel-Reassortanten zehnmal, die Triple-Reassortanten fünfmal hintereinander im Hühnerei passagiert. Pro Infektion und Virus wurden jeweils drei bis zehn Eier eingesetzt.

Bestimmung der Virusausbeute anhand der infektiösen Einheiten (PFU/ml):

Die erzielten Ergebnisse förderten keine ausgeprägten Unterschiede in den PFU-Titern bei den PR8- und den FPVmut-Doppel-Reassortanten zutage (siehe Abbildung 5-13 A). Die Mittelwerte lagen insgesamt in einem Bereich von 8×10^7 bis 3×10^{11} PFU/ml und variierten in den meisten Fällen um weniger als eine halbe und niemals mehr als eine log₁₀ Stufe zwischen beiden Hintergrundstämmen.

Auch für die Triple-Reassortanten gilt, dass beide Akzeptorstämme vergleichbare PFU-Titer aufwiesen (siehe Abbildung 5-13 B). Die Mittelwerte liegen hierbei in einem Bereich von $1,91 \times 10^7$ bis $4,19 \times 10^{10}$ PFU/ml und die Ergebnisse weichen in der Regel nicht mehr als eine halbe und mit Ausnahme der ersten Passage der H3N2-Reassortanten nie mehr als eine log₁₀ Stufe voneinander ab. Abgesehen von der ersten Passage der H3N2-Reassortanten in beiden Hintergrundstämmen sind die erhaltenen Mittelwerte der Triple-Reassortanten höher als die der korrespondierenden Doppel-Reassortanten der entsprechenden Ei-Passage.

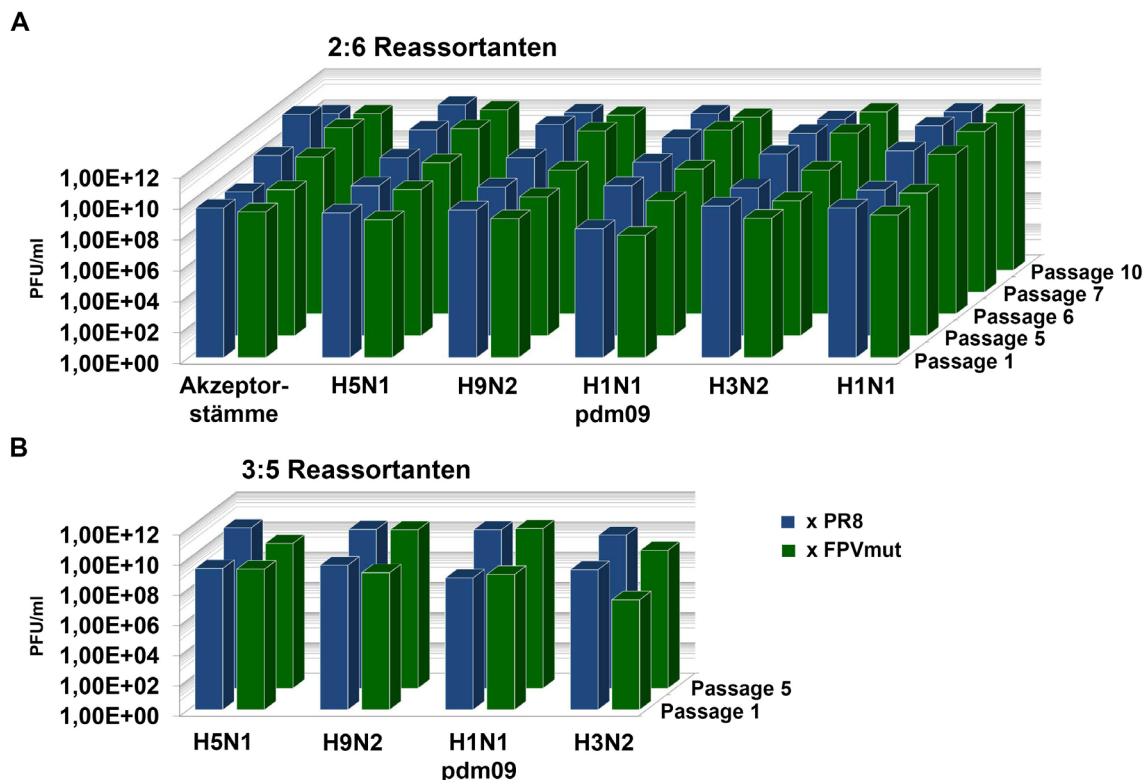


Abbildung 5-13 Bestimmung der PFU-Titer der rekombinanten Viren im Hühnerei

Dargestellt sind die Mittelwerte aus den PFU-Bestimmungen der im Hühnerei vermehrten rekombinanten Viren, wobei die blauen Balken den Daten der Viren im PR8- und die grünen den des FPVmut-Akzeptors entsprechen. (A) Mittelwerte der PFU-Titer der Doppel-Reassortanten der Passage 1, 5, 6, 7 und 10. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, bis auf die 6. Passage mit acht und die 10. Passage mit vier Messwerten. (B) Ergebnisse der 1. und 5. Passage der Triple-Reassortanten, wobei für die erste Passage eine Doppel- und die letzte eine Einzelbestimmung durchgeführt wurden.

Bestimmung der Virusausbeute anhand des HA-Titers:

Im folgenden Abschnitt werden die erhaltenen HA-Antigenausbeuten im Hühnerei anhand der gemessenen HA-Titer dargestellt. Dabei wird der Fokus zunächst auf die pandemischen und potenziell pandemischen Isolate gelegt, da die im Rahmen der Untersuchungen zur Ausbreitungsgeschwindigkeit der Infektion erhaltenen Daten auf einen positiven Einfluss des aviären Akzeptorstammes bei der Verwendung aviärer Donorviren hindeuten (siehe 5.3.2). In der Regel werden solche aviären Isolate bei der Herstellung pandemischer Impfstoffe verwendet, wo eine hohe Antigenausbeute besonders relevant ist. Daher werden zuerst die Reassortanten des H1N1pdm09-, H9N2- und H5N1-Isolates anhand der erzielbaren Durchschnittswerte eingehend charakterisiert, wobei bei der Auswertung zur Ermittlung der durchschnittlichen HA-Titer nur infizierte Eier, bei denen nachweislich eine produktive Infektion mit einem HA-Titer über 2^3 gemessen wurde, berücksichtigt wurden (siehe Abbildung 5-14). Anschließend wurden die maximalen Ausbeuten aller generierten Reassortanten untersucht (siehe Tabelle 7).

Für das H1N1pdm09-Isolat lagen in sechs Passagen die mit den FPVmut-Doppel-Reassortanten erzielten Ausbeuten unter den der PR8-Doppel-Reassortanten. Der höchste gemessene Durchschnittswert von $12,6 \log_2$ wurde im PR8-Hintergrund erzielt. Das Einbringen des homologen M-Gensegmentes bewirkte eine gesteigerte Ausbeute im FPVmut-Hintergrund gegenüber den PR8-Triple-Reassortanten, jedoch keine Verbesserung im Vergleich zu den PR8-Doppel-Reassortanten.

Bei dem H5N1-Isolat erwies sich die Verwendung des FPVmut-Akzeptorstammes gegenüber dem PR8 als klarer Vorteil. Im Durchschnitt wurden in beiden genetischen Zusammensetzungen kontinuierlich höhere HA-Ausbeuten im FPVmut-Hintergrund erzielt und die höchsten mittleren HA-Titer von $12,6 \log_2$ wurden mit dem FPVmut-Akzeptorstamm erreicht, dies gelang mit den Doppel-Reassortanten in der 8. Passage und den Triple-Reassortanten in der 5. Passage.

Für das H9N2-Isolat erwies sich bei den Doppel-Reassortanten über die Passagen hinweg insgesamt keiner der beiden Hintergrundstämme als eindeutig ertragreicher. Im PR8-Hintergrund wurde ein maximaler Durchschnittswert von $12,6 \log_2$ in der zweiten Passage und im FPVmut in der siebten Passage gemessen. In den Passagen drei bis fünf wirkte sich das Vorhandensein des H9N2-M-Gensegmentes positiv auf die HA-Ausbeute im FPVmut-Hintergrund gegenüber den FPVmut-Doppel-Reassortanten aus, jedoch wurde dieser Effekt nicht bei den PR8-Reassortanten beobachtet.

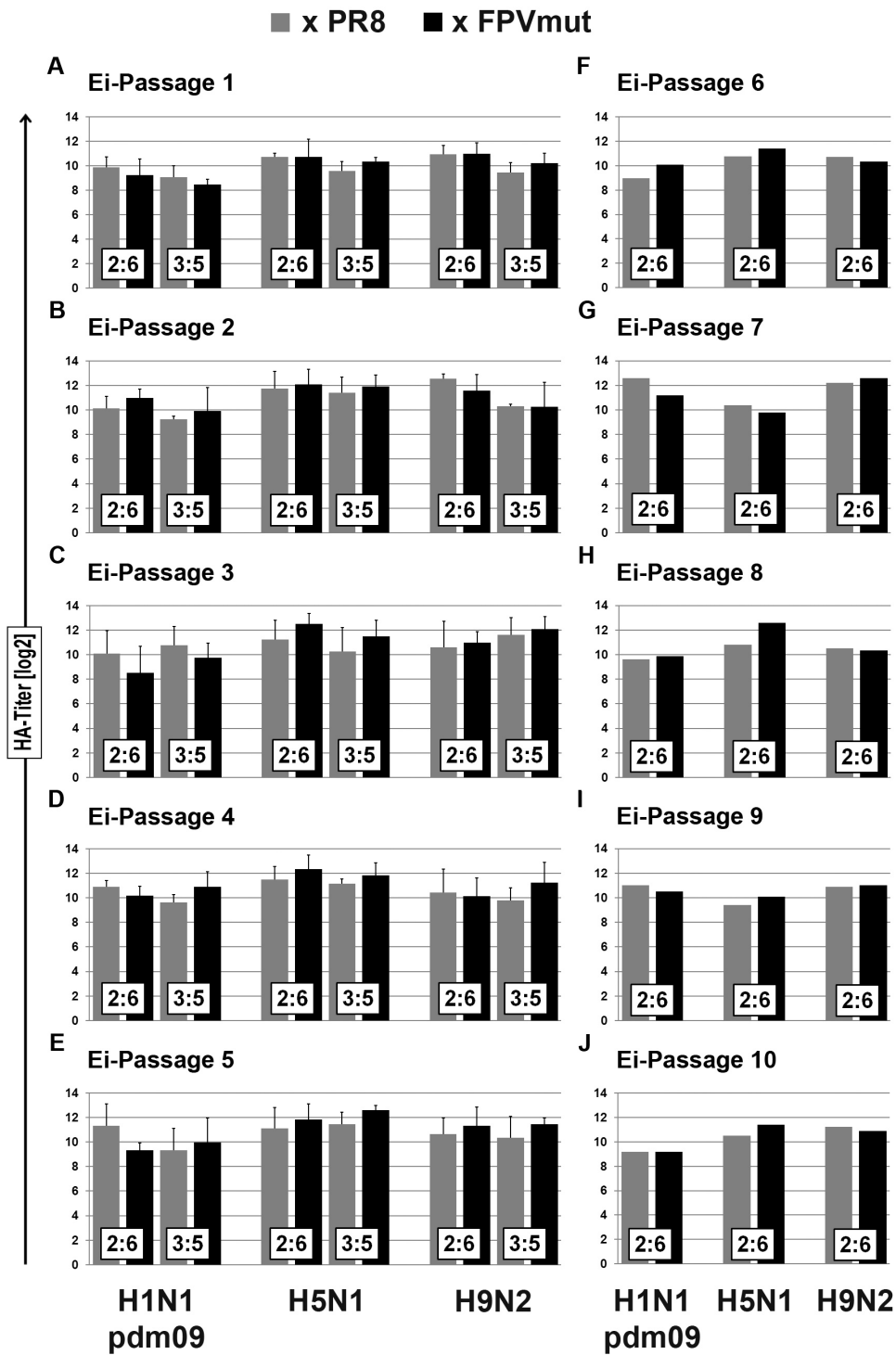


Abbildung 5-14 Gemittelte Ausbeuten an HA-Einheiten bei Vermehrung im Hühnerei

Darstellung der erzielten Mittelwerte der HA-Titer [log2] nach Anzucht im Hühnerei gemessen mit Hühnererythrozyten, wobei die grauen Balken den Daten der PR8- und die schwarzen denen der FPVmut-Reassortanten entsprechen. (A-E) Bis zur 5. Passage wurden Daten aus drei unabhängigen Infektionsexperimenten verwendet, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte der einzelnen Experimente an. (F-J) Ab der 6. Passage sind die Daten der Doppel-Reassortanten aus einem einzelnen Infektionsexperiment dargestellt. Pro Infektion und Virus wurden jeweils drei bis zehn Eier eingesetzt. Die Ergebnisse der H1N1pdm09-Reassortanten entsprechen jeweils dem ersten Datenblock, die der H5N1- dem mittleren und die der H9N2-Reassortanten dem letzten Block.

Ergebnisse

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Leistungsfähigkeit der unterschiedlichen Vermehrungssysteme beurteilt. Hierzu eignen sich am besten die maximal erzielten Ausbeuten (siehe Tabelle 7), die gegebenenfalls nach Optimierung der Anzuchtbedingungen kontinuierlich erreicht werden könnten. Für das H1N1pdm09-Isolat lagen die maximalen Ausbeuten der FPVmut-Doppel-Reassortanten in den späten Passagen über denen der PR8-Reassortanten, nicht jedoch über den Maximalwerten der in den frühen Passagen mit dem PR8-Akzeptorstamm erzielten Ergebnisse. In den H1N1pdm09-Triple-Reassortanten wurden die höheren Ausbeuten im FPVmut-Hintergrund erreicht, welche den Ergebnissen der H1N1pdm09-Doppel-Reassortanten im PR8-Hintergrund aber ebenfalls nicht überlegen waren. Für das H5N1 bestätigte sich die Überlegenheit des FPVmut gegenüber dem PR8 in beiden genetischen Konstellationen, allerdings lagen die mit den Doppel-Reassortanten erzielten Ergebnisse höher als die der Triple-Reassortanten. Beim H9N2 – dem zweiten aviären Isolat – zeigten sich nach dem Einbringen des homologen M-Gensegmentes höhere HA-Titer im FPVmut-Hintergrund als bei den PR8-Reassortanten. Diese blieben in der Regel aber unter den maximal erreichten Werten der Doppel-Reassortanten in beiden Hintergrundstämmen. Für die Reassortanten mit dem saisonalen H3N2-Isolat konnten im FPVmut-Hintergrund bei den Doppel-Reassortanten und den späteren Passagen der Triple-Reassortanten höhere maximale Ausbeuten erzielt werden. Das zweite saisonale H1N1-Isolat erzielte hingegen im PR8-Akzeptorstamm höhere HA-Ausbeuten.

Tabelle 7: Maximale Ausbeute an HA-Einheiten bei Vermehrung im Hühnerei

Darstellung der jeweils höchsten HA-Titer [log2] nach Anzucht im Hühnerei, gemessen mit Hühnererythrozyten. Bei den H1N1pdm09-, dem H5N1- und den H9N2-Reassortanten wurden die Ergebnisse bis zur 5. Passage (P.) aus drei unabhängigen Infektionsexperimenten gemittelt. Alle anderen Ergebnisse wurden anhand eines einzelnen Infektionsexperimentes erhoben. Die Ergebnisse für die FPVmut-Reassortanten wurden den PR8-Reassortanten gegenübergestellt (FPVmut/PR8). Farbige unterlegte Felder kennzeichnen die Passagen, in denen die HA-Ausbeuten der FPVmut-Reassortanten höher (rot), identisch (orange) oder niedriger (gelb) als die der PR8-Reassortanten waren. Ein Strich zeigt an, dass für diese Passagen keine Messdaten erhoben wurden. * Virus konnte nur mit Meerschwein-, nicht aber mit Hühnererythrozyten nachgewiesen werden.

P.	max. HA-Titer FPVmut/PR8-Akzeptorstamm [log2]									
	H1N1pdm09		H5N1		H9N2		H3N2		H1N1	
	2:6	3:5	2:6	3:5	2:6	3:5	2:6	3:5	2:6	3:5
1	9,3/11,0	10,0/10,0	12,3/11,8	10,8/11,2	11,3/11,8	11,0/10,3	11,0/10,0	7,0/10,0	11,0/13,0	
2	11,5/12,2	11,3/10,7	12,7/12,7	12,3/8,0	12,2/13,0	12,0/10,8	12,0/10,0	9,0/10,0	13,0/13,0	
3	10,5/12,0	9,8/11,3	12,7/12,7	11,7/10,7	11,3/12,3	12,5/12,0	10,0/9,0	0,0*/9,0	13,0/13,0	
4	11,0/11,8	11,3/9,7	12,5/11,8	12,3/11,8	11,8/12,3	11,3/10,3	12,0/9,0	10,0/9,0	11,0/13,0	
5	10,5/12,0	12,0/11,0	12,8/12,3	13,0/8,0	11,8/12,9	12,0/11,3	13,0/10,0	13,0/0,0	11,0/13,0	
6	11,5/10,0	-	13,0/11,5	-	12,0/12,0	-	9,0/8,5	-	13,0/13,0	
7	10,0/11,5	-	13,0/13,0	-	12,0/13,0	-	11,0/9,0	-	11,0/13,0	
8	11,0/11,0	-	13,0/11,0	-	11,0/13,0	-	10,0/8,0	-	11,0/13,0	
9	11,0/10,0	-	11,0/11,0	-	11,0/12,0	-	10,0/9,0	-	11,0/11,5	
10	10,0/9,5	-	12,0/11,0	-	11,5/12,0	-	9,0/9,0	-	11,0/12,0	

Mit beiden Hintergrundstämmen wurden also insgesamt vergleichbare PFU-Titer erhalten, dieser Befund ist unabhängig von der Anzahl der Passagen und der genetischen Zusammensetzung der Reassortanten gültig. Bei der Analyse der maximalen HA-Titer erwies sich bei den Reassortanten des saisonalen H1N1-Isolates der PR8-Hintergrund und bei den des saisonalen H3N2-Isolates der FPVmut-Akzeptorstamm als effizienter. In den H1N1pdm09-Reassortanten konnten durch das Einbringen des homologen M-Gensegmentes die HA-Titer in den FPVmut-Reassortanten gesteigert werden, diese blieben jedoch unterhalb der erzielbaren Werte der PR8-Doppel-Reassortanten. Für das H9N2-Isolat konnte kein eindeutiger Unterschied in den durchschnittlichen HA-Titern für die Doppel-Reassortanten beider Hintergrundstämme festgestellt werden, der PR8-Akzeptor wirkte sich jedoch positiv auf die erzielten maximalen Ausbeuten aus. Bei dem H5N1 ließen sich mit dem FPVmut-Hintergrund insgesamt höhere HA-Titer erzielen.

5.4.1.2 Messung des absoluten HA-Gehalts in der Allantoisflüssigkeit

Der einfache radiale Immundiffusionstest (*single-radial-immunodiffusion-assay*=SRID) ist der im europäischen Arzneibuch für die Bestimmung des Hämagglutinin-Gehaltes vorgeschriebene Standard-Assay [149;153], der routinemäßig zur Chargentestung von Influenzaimpfstoffen eingesetzt wird. Die Methode basiert auf dem Nachweis ringförmiger Präzipitate, die aufgrund der Reaktion des HA-Antigens mit spezifischen HA-Antiseren gebildet werden. Der HA-Gehalt der Probe kann durch den Vergleich der Präzipitationsringgrößen über einen Referenzstandard mit einer festgelegten Konzentration quantifiziert werden.

Für den SRID-Assay wurden die subtypspezifischen Antiseren in einer Agaroseschicht immobilisiert. Die Viruspräparationen wurden in drei Verdünnungen und in jeweils dreifacher Bestimmung in vorgestanzte Löcher aufgetragen. Im Anschluss an die 22-stündige Inkubation, in der die Proben in die Agarose diffundierten und die Bildung der Immunpräzipitate erfolgte, konnten mittels der Software „Metric“ die Flächen der mit Coomassie angefärbten Präzipitationsringe ermittelt werden (siehe Abbildung 5-15). Daraus wurde unter Bezugnahme auf den Referenzstandard mit der Statistik-Software „Combistats“ der HA-Gehalt errechnet. Bei dem SRID-Assay handelt es sich somit um einen immunologischen Antigennachweis. Die Ausbildung eines Präzipitationsringes kann hierbei nur erfolgen, wenn Antigen und Antikörper spezifisch miteinander reagieren. Zum Nachweis der Spezifität der verwendeten Antiseren wurden teilweise auch nicht kompatible Antigene aufgetragen. Es zeigte sich, dass der Test bei abweichendem Subtypen kein auswertbares Ergebnis lieferte (Daten nicht gezeigt).

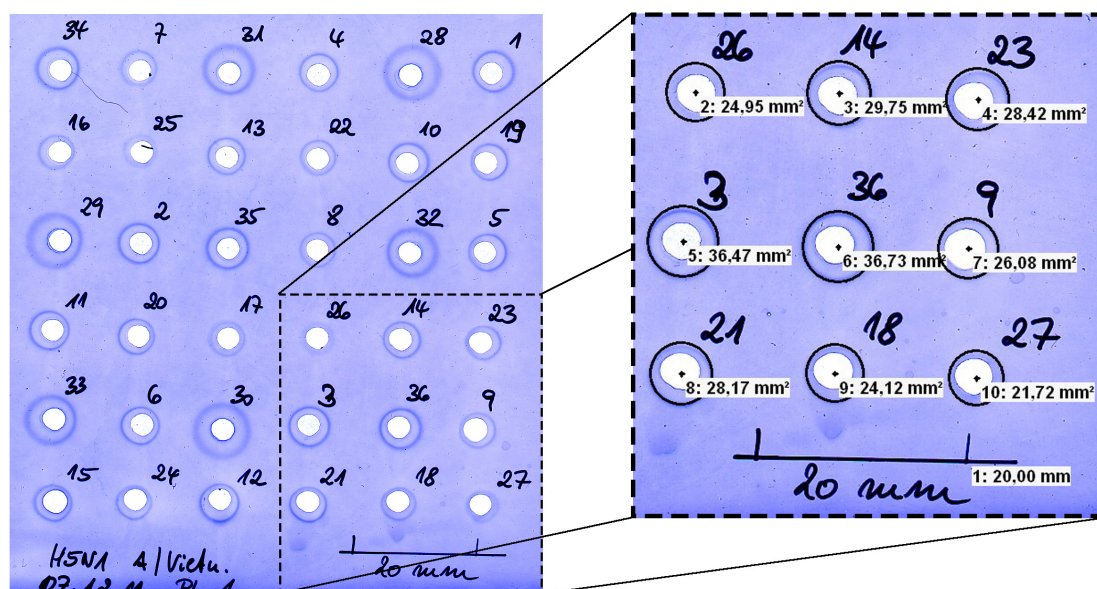


Abbildung 5-15 Exemplarische Darstellung einer SRID-Assay Platte und deren Auswertung

Das H5N1-spezifische Antiserum wurde in der Agarose immobilisiert und anschließend 36 Löcher hineingestanz. Pro Platte konnten neben der Referenz drei Proben, deren Antigengehalt ermittelt werden sollte, aufgetragen werden. Das Auftragsschema, bei dem jede Verdünnung sowohl mittig als auch am Rand appliziert wurde, wird im Folgenden exemplarisch anhand der Referenz dargestellt: Probe 28-30 unverdünnte Referenz, Probe 31-33 ist die 2:3 und Probe 34-36 die 1:3 Verdünnung (siehe 4.5.5). Nach der Diffusion wurden die Präzipitationsringe durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Der vergrößerte Bildausschnitt stellt die Ausmessung der Ringfläche mittels der Metric Software dar (schwarze Ringe). Durch Eingabe der Flächengrößen in das Combistats-Programm kann über die mitgeführte Referenz der Antigengehalt der untersuchten Probe ermittelt werden.

Mittels des SRID-Assays wurde der Antigengehalt der Allantoisflüssigkeit von infizierten, embryonierten Hühnereiern ermittelt. Dabei wurden Daten aus bis zu drei unabhängigen Infektionsexperimenten erhoben und der Mittelwert aller gemessenen HA-Gehalte pro Ei-Passage berechnet. Die Doppel-Reassortanten wurden bis zu zehnmal, die Triple-Reassortanten fünfmal hintereinander im Hühnerei passagiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die jeweiligen Virussubtypen beschrieben.

SRID-Assay Ergebnisse der Reassortanten des H5N1-Subtyps:

Für das H5N1-Isolat ermöglichte die Verwendung des FPVmut-Hintergrundstamms eine deutliche Steigerung der HA-Ausbeuten. In den Doppel-Reassortanten waren die mittleren HA-Mengen bis zur fünften Passage im FPVmut-Hintergrund signifikant höher als bei dem PR8-Akzeptor (siehe Abbildung 5-16 A). Besonders deutlich zeigte sich der positive Einfluss sowohl in der ersten Ei-Passage mit einem Wert von $20,8 \pm 6,09 \mu\text{g/ml}$ (im Vergleich zu $12,9 \pm 4,7 \mu\text{g/ml}$ im PR8) als auch in der dritten Passage mit $23,5 \pm 3,41 \mu\text{g/ml}$ (zu $15,4 \pm 7,32 \mu\text{g/ml}$). Der beste Einzelwert der ersten Passage lag im FPVmut-Hintergrund mit $27,9 \mu\text{g/ml}$ 1,47-fach über dem der PR8-Reassortante. Auch die FPVmut-Triple-Reassortanten waren den PR8-Reassortanten bezüglich der HA-Ausbeuten überlegen

Ergebnisse

(siehe Abbildung 5-16 B), nicht jedoch ergiebiger im Ertrag als die FPVmut-Doppel-Reassortanten. Der positive Einfluss des FPVmut zeigte sich bei den Triple-Reassortanten besonders in der 2. Passage mit einem mittleren HA-Wert von $19,3 \pm 9,7 \mu\text{g/ml}$, gegenüber $6,7 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$ beim PR8. Auffällig waren die sehr hohen Einzelwerte der FPVmut-Triple-Reassortanten der 2. und 3. Passage von 39,4 bzw. 42,6 $\mu\text{g/ml}$, die durch wiederholte Austestung bestätigt werden konnten. Diese Ergebnisse lagen um ein vielfaches über allen Werten, die mit dem PR8 als Akzeptorstamm oder den FPVmut-Doppel-Reassortanten generiert werden konnten. Sie können als Hinweis auf die optimale Leistungsfähigkeit des FPVmut als Akzeptorstamm für die H5N1-Proteine angesehen werden.

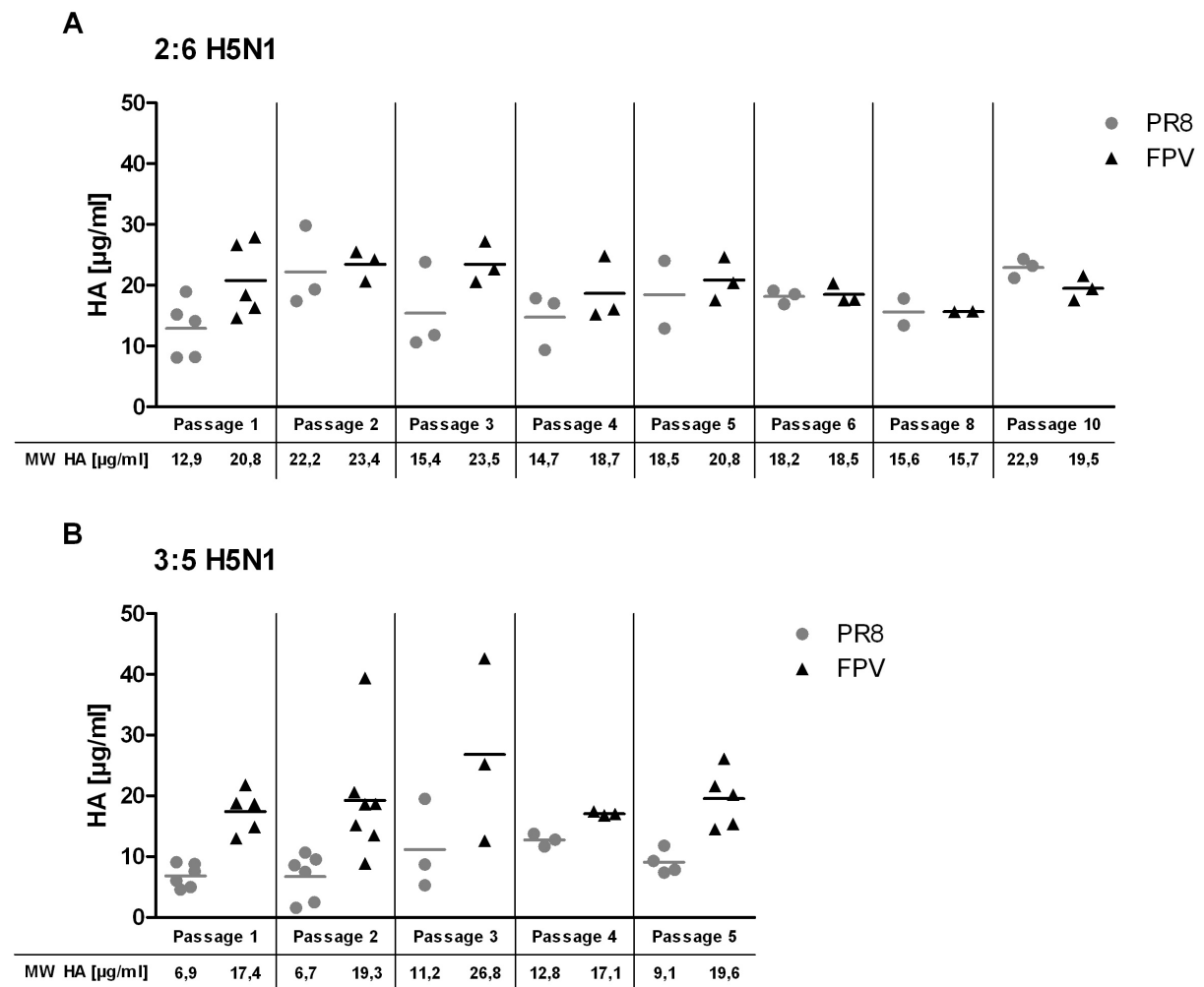


Abbildung 5-16 Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H5N1-Reassortanten

Dargestellt sind die über den SRID-Assay ermittelten HA-Ausbeuten in der Allantoisflüssigkeit von infizierten, embryonierten Hühnereiern aus bis zu drei unabhängigen Infektionsexperimenten. Die Doppel-Reassortanten wurden bis zu zehnmal, die Triple-Reassortanten bis zu fünfmal nacheinander passagiert. Jedes Symbol zeigt das Ergebnis eines infizierten Hühnereis oder eines Pools unterschiedlicher Eier einer Infektion, wobei graue Kreise die PR8-Reassortanten und schwarze Dreiecke die FPVmut-Reassortanten repräsentieren. Die Balken geben den Mittelwert (MW) an, dessen Wert zusammen mit der Passagen-Bezeichnung unter dem Diagramm aufgeführt ist. (A) Zeigt die Ergebnisse der Doppel-Reassortanten (B) die der Triple-Reassortanten.

SRID-Assay Ergebnisse der Reassortanten des H9N2-Subtyps:

Bei den Doppel-Reassortanten des H9N2-Subtyps erwies sich im Gegensatz zu dem H5N1-Isolat die Verwendung des PR8 als Akzeptorstamm als Vorteil, da die mit dem FPVmut-Hintergrundstamm erzielten HA-Ausbeuten nur 44-67 % der Ausbeuten der PR8-Reassortanten erreichten (siehe Tabelle 8).

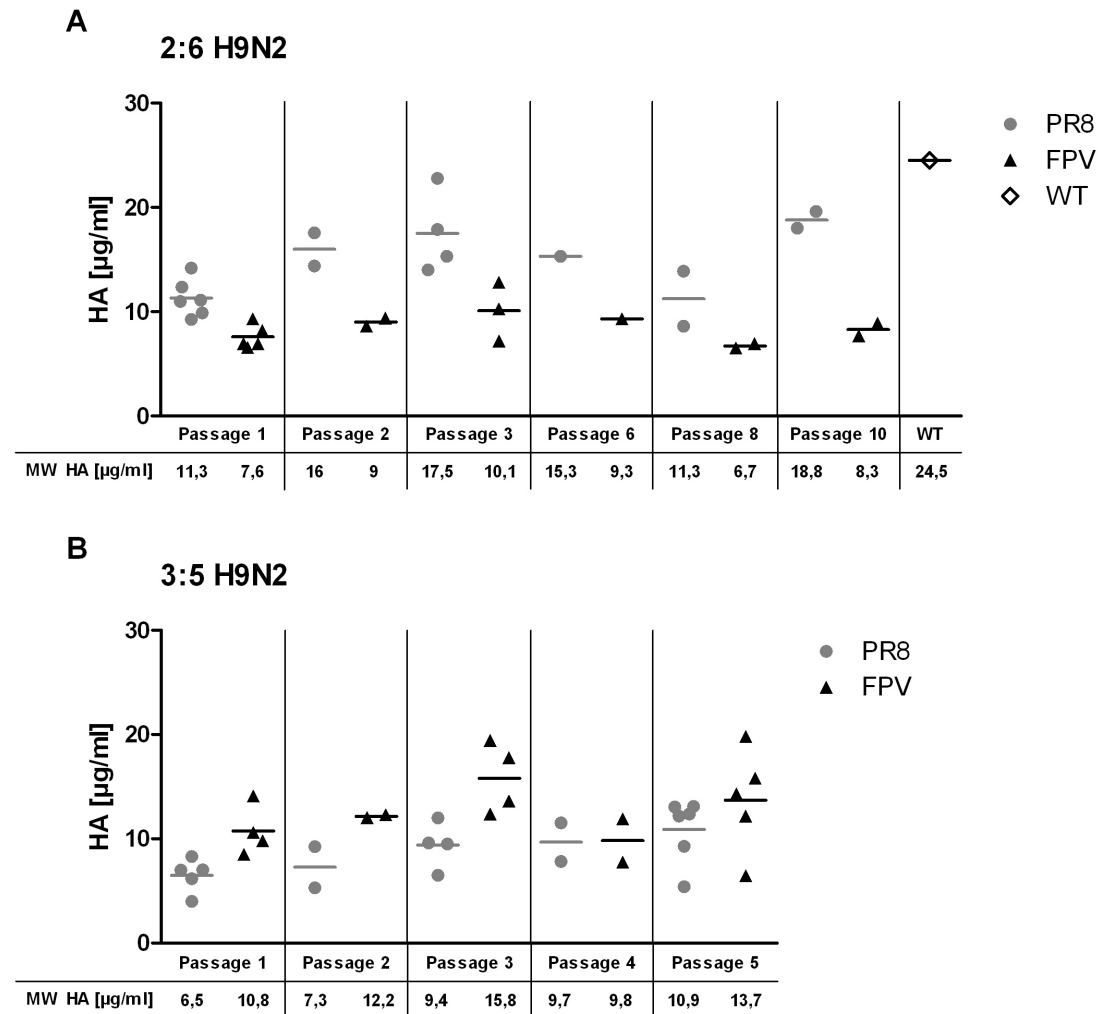


Abbildung 5-17 Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H9N2-Reassortanten

(A) Enthält die Ergebnisse der HA-Ausbeuten der Doppel-Reassortanten sowie in der letzten Spalte eine Einzelmessung für das H9N2-Wildtypisolat (WT), aus dem die Gensegmente ursprünglich isoliert wurden. (B) Stellt die Ergebnisse der Triple-Reassortanten dar. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Bildlegende bei der Abbildung 5-16.

Das Einbringen des korrespondierenden aviären M-Gensegmentes wirkte sich allerdings deutlich positiv auf den HA-Gehalt im FPVmut-Hintergrundstamm aus und ermöglichte eine Steigerung der HA-Ausbeute um den Faktor 1,5. Die erzielten Werte der FPVmut-Triple-Reassortanten sind vergleichbar mit denen der PR8-Doppel-Reassortanten (siehe Abbildung 5-17); so war in der ersten Passage der höchste Einzelwert der FPVmut-Triple-Reassortante mit 14,1 µg/ml nahezu identisch mit dem der PR8-Doppel-Reassortante von 14,2 µg/ml. Der

höchste überhaupt gemessene Einzelwert einer PR8-Doppel-Reassortante lag mit 22,8 µg/ml nur wenig über dem höchsten Einzelwert einer FPVmut-Triple-Reassortante mit 19,82 µg/ml.

Der positive Effekt des homologen M-Gensegments zeigte sich jedoch nicht im PR8-Hintergrund. Hier lagen die erzielten Ausbeuten in den ersten drei Passagen im Durchschnitt 1,9 fach unter denen der entsprechenden PR8-Doppel-Reassortanten.

Neben den Reassortanten wurde auch die Antigenausbeute des H9N2-Wildtypisolats untersucht, aus dem die Gensegmente ursprünglich isoliert worden waren. Hierbei wurde der höchste gemessene HA-Einzelwert von 24,5 µg/ml ermittelt (siehe Abbildung 5-17 A).

SRID-Assay Ergebnisse der Reassortanten des H1N1pdm09-Subtyps:

Für alle H1N1pdm09-Reassortanten war die HA-Ausbeute in beiden Akzeptorstämmen relativ gering. Auch für dieses Isolat zeigte sich erneut der positive Einfluss des homologen M-Gens auf die HA-Ausbeute im FPVmut-Hintergrundstamm. Alle Mittelwerte der FPVmut-Triple-Reassortanten waren höher als die der FPVmut-Doppel-Reassortanten und lagen z.T. auch über denen der PR8-Triple-Reassortanten (siehe Abbildung 5-18). Der maximale erzielte Einzelwert einer FPVmut-Triple-Reassortante lag mit 13,62 µg/ml etwas über dem der PR8-Doppel-Reassortanten mit 12,3 µg/ml. Im Unterschied zu den Triple-Reassortanten des H5N1- und des H9N2-Isolates schien das isolatspezifische M im Falle des H1N1pdm09-Isolates auch im PR8-Hintergrund einen positiven Einfluss auf die HA-Ausbeute zu nehmen. Zwar zeigte sich dies nicht offenkundig im Vergleich der Mittelwerte von Doppel- und Triple-Reassortanten des PR8, jedoch lagen in der Regel die höchsten gemessenen Einzelwerte der Triple-Reassortanten über den höchsten Werten der PR8-Doppel-Reassortanten der gleichen Passage. Zusätzlich wurden die mit Abstand höchsten Einzelmessungen von 22 bzw. 22,26 µg/ml, die durch Wiederholung des SRID-Assays bestätigt wurden, bei einer Infektion der dritten Passage mit einer PR8-Triple-Reassortante erzielt (siehe Abbildung 5-18 B).

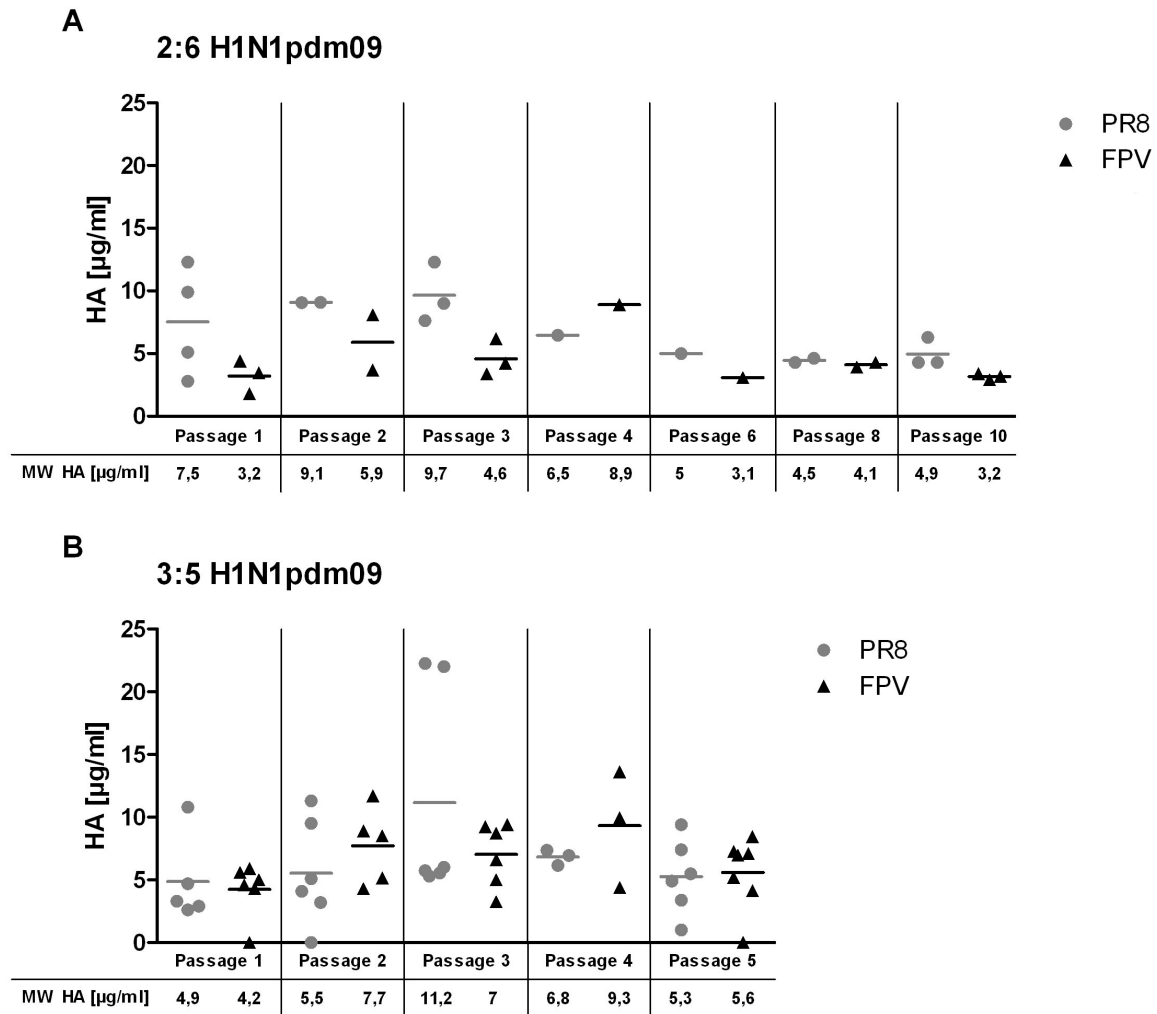


Abbildung 5-18 Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H1N1pdm09-Reassortanten

(A) Enthält die Ergebnisse der HA-Ausbeuten der Doppel-Reassortanten (B) Zeigt die Ergebnisse der Triple-Reassortanten. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Bildlegende bei der Abbildung 5-16.

SRID-Assay Ergebnisse der Reassortanten des H3N2-Subtyps:

Für das saisonale H3N2-Isolat war die Verwendung des humanen PR8 von Vorteil für die HA-Ausbeute (siehe Abbildung 5-19 und Tabelle 8). Hierbei zeigte sich kein positiver Effekt durch das Vorhandensein des homologen M-Gensegments. Bei dem FPVmut-Hintergrund hingegen wurde der höchste gemessene HA-Gehalt von 11,6 µg/ml bei einer Triple-Reassortante erreicht.

Zusätzlich wurden die mit dem H3N2-Wildtypisolat erreichbaren Antigenausbeuten analysiert. Wie die Ergebnisse zeigen, befindet sich der Mittelwert aus zwei unterschiedlichen Infektionsexperimenten im gleichen Bereich, in dem auch die mit den FPVmut-Doppel-Reassortanten erzielten Werte liegen (siehe Abbildung 5-19 A).

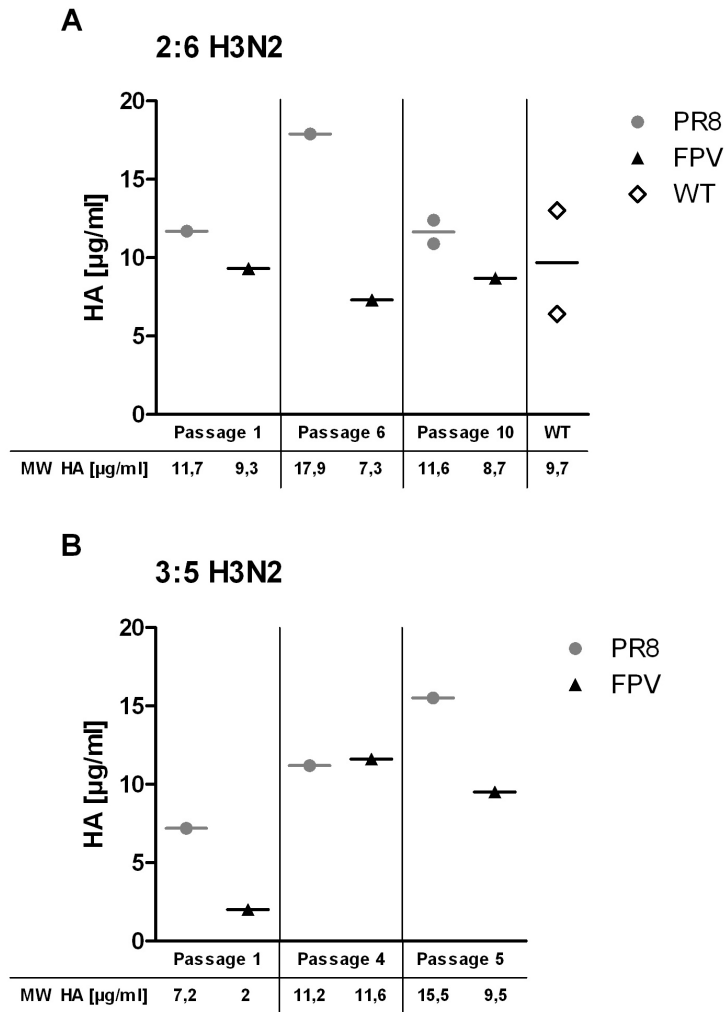


Abbildung 5-19 Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H3N2-Reassortanten

(A) Enthält die Ergebnisse der HA-Ausbeuten der Doppel-Reassortanten sowie in der letzten Spalte eine Doppelmessung für das H3N2-Wildtypisolat (WT), aus dem die Gensegmente ursprünglich isoliert wurden. (B) Zeigt die Ergebnisse der Triple-Reassortanten. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Bildlegende bei der Abbildung 5-16.

SRID-Assay Ergebnisse der Reassortanten des H1N1-Subtyps:

Ebenso wie bei dem humanen saisonalen H3N2-Isolat erwies sich auch bei den H1N1-Reassortanten die Verwendung des PR8-Hintergrundstamms als ertragreicher. Mit dem FPVmut-Hintergrundstamm konnten nur 26-34 % der HA-Ausbeute der PR8-Reassortanten erzielt werden (siehe Abbildung 5-20 und Tabelle 8). Bei diesem Isolat konnten in beiden Hintergrundstämmen keine Triple-Reassortanten generiert werden, so dass der Einfluss des M-Gensegments auf die Antigenmenge nicht untersucht werden konnte.

Der mit einer PR8-Doppel-Reassortanten erreichte maximale HA-Wert von 19,9 µg/ml lag dabei deutlich über dem Wert des zur Genisolierung eingesetzten Wildtypvirus von 9,1 µg/ml.

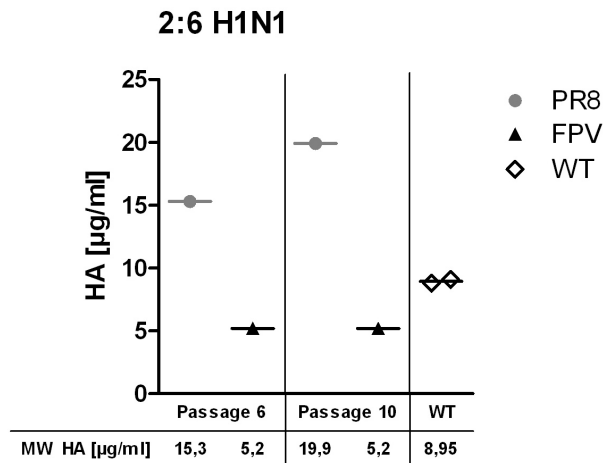


Abbildung 5-20 Einzel- und Mittelwerte der SRID-Assay Ergebnisse der H1N1-Reassortanten

Dargestellt sind die Ergebnisse der H1N1-Doppel-Reassortanten sowie in der letzten Spalte eine Doppelmessung für das H1N1-Wildtypisolat (WT), aus dem die Gensegmente ursprünglich isoliert worden waren. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Bildlegende bei der Abbildung 5-16.

Die beschriebenen Ergebnisse der HA-Antigenausbeuten in den unterschiedlichen Hintergrundstämmen – in Abhängigkeit von der genetischen Zusammensetzung und der Passage – sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Aufgeführt ist das Verhältnis der in beiden viralen Hintergründen erzielbaren HA-Antigenmengen. Isolatspezifisch lassen sich die Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen:

- a) Der Einsatz des FPVmut als Akzeptorstamm für das potenziell pandemische H5N1-Isolat führte zu einer deutlichen Steigerung der HA-Ausbeuten im Vergleich zum konventionellen PR8-System. Das Vorhandensein des homologen M-Gensegments wirkte sich im Vergleich zum PR8 deutlich positiv auf den HA-Gehalt im FPVmut-Hintergrund aus, bewirkte aber insgesamt keine Steigerung im Vergleich zu den FPVmut-Doppel-Reassortanten.
- b) Die Nutzung des FPVmut als Hintergrundstamm wirkte sich im Fall des H9N2-Isolates – im Gegensatz zu den Befunden des H5N1-Subtyps – bei den Doppel-Reassortanten nicht positiv auf die Antigenausbeute aus. Durch die Integration des homologen M-Gensegments konnten jedoch im FPVmut-Akzeptor annähernd gleiche HA-Ausbeute in beiden Akzeptorstämmen erzielt werden.
- c) Das Vorhandensein des homologen M-Gensegmentes führte zu einer Steigerung der HA-Ausbeuten des H1N1pdm09-Isolats, wobei die insgesamt besten Resultate aber mit den PR8-Doppel-Reassortanten erzielt wurden.
- d) Bei den humanen saisonalen H1N1- und H3N2-Isolaten erwies sich die Verwendung des FPVmut eher als Nachteil für die gemessenen HA-Ausbeuten.

Tabelle 8: Prozentuale HA-Ausbeuten des FPVmut im Vergleich zu PR8 im SRID-Assay

Dargestellt sind die prozentualen Vergleiche der gemittelten HA-Ausbeuten im FPVmut-Hintergrundstamm im Verhältnis zum PR8 in Abhängigkeit von der genetischen Zusammensetzung und der Passage im Hühnerei-System. Die Werte wurden mit dem SRID-Assay ermittelt. Ein Strich bedeutet, dass für diese Eingruppierung keine Messdaten erhoben wurden.

Ei-Passage:	HA Ausbeute FPVmut/PR8 Akzeptorstamm [%]								
	H5N1		H9N2		pdmH1N1		H3N2		H1N1
	2:6	3:5	2:6	3:5	2:6	3:5	2:6	3:5	2:6
1	161	252	67	166	43	86	79	28	-
2	105	288	56	168	65	140	-	-	-
3	152	239	58	168	47	63	-	-	-
4	127	134	-	101	137	137	-	104	-
5	112	215	-	126	-	106	-	61	-
6	102	-	61	-	62	-	41	-	34
8	101	-	59	-	91	-	-	-	-
10	85	-	44	-	64	-	75	-	26

Die erhobenen Daten belegen, dass das Potenzial des FPVmut, die HA-Antigenausbeute im Vergleich zum PR8-System zu steigern, abhängig von dem verwendeten Donorvirus-Isolat ist. Dies zeigt sich insbesondere bei dem H5N1-Virus. Auch der positive Einfluss der Bereitstellung des homologen M-Gensegmentes zeichnet sich durch eine isolatspezifische Abhängigkeit aus.

5.4.1.3 Proteinzusammensetzung der rekombinanten Influenzaviren

Um mögliche Einflüsse der unterschiedlichen Akzeptorstämme und der integrierten Donorproteine auf die Zusammensetzung der rekombinanten Viren zu untersuchen, wurde die Proteinzusammensetzung der im Hühnerei vermehrten rekombinanter Viren zum einen durch Messung der HA-Antigenmengeverhältnisse sowie zum anderen durch die Analyse des HA/NP-Verhältnisses im Immunoblot charakterisiert.

Für diese Untersuchung wurde die Allantoisflüssigkeit infizierter Hühnereier unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE analysiert, um die Dissoziation der HA₀-Vorläuferform in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ zu verhindern (siehe Abbildung 5-21).

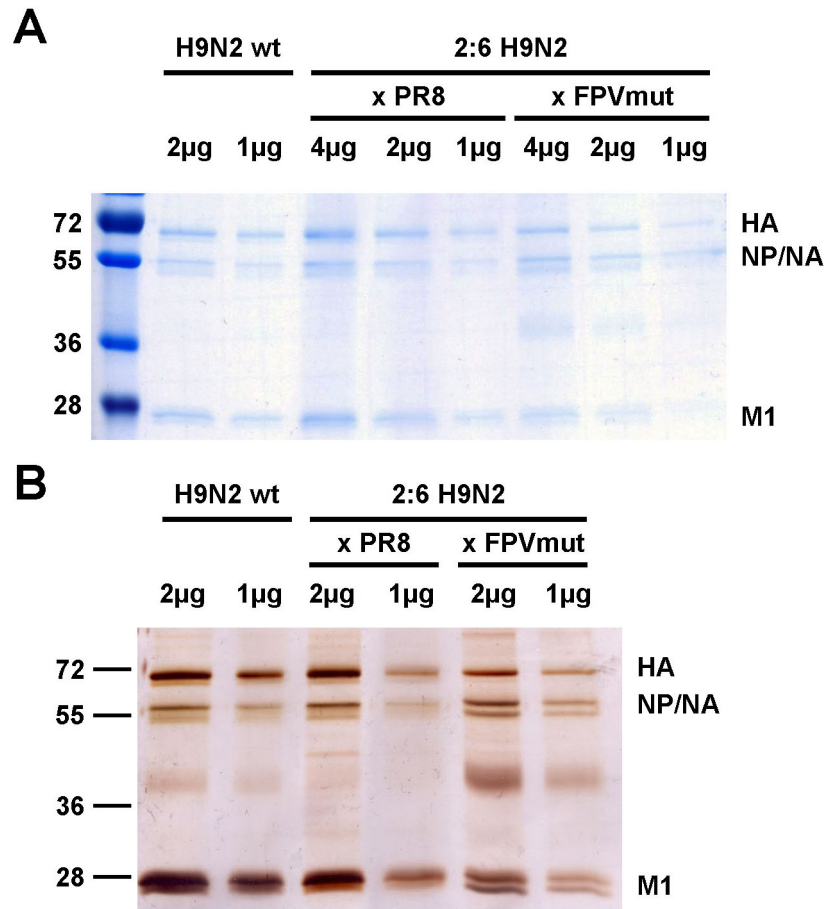


Abbildung 5-21 Elektrophoretische Auftrennung der Allantoisflüssigkeit infizierter Hühnereier

(A) Exemplarische Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung im Hühnerei vermehrter H9N2-Wildtypviren (wt) und der H9N2-Doppel-Reassortanten in beiden Hintergrundstämmen. Es wurden bei den Wildtypviren 1 bzw. 2 µg und bei den Reassortanten 1, 2 bzw. 4 µg Gesamtprotein in einem 10 %-igem SDS-Trenngel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Färbung der Proteine erfolgte mittels des *Colloidal Blue Staining* Kit der Firma Invitrogen. (B) Identische Auftrennungsbedingungen wie bei der Coomassie-Blau-Färbung, wobei in diesem Fall die Visualisierung der Proteine mittels Silberfärbung erfolgte.

Die Proteinquantifizierung wurde mit dem Odyssey Infrared Imaging System der Firma Licor durchgeführt. Hierfür wurde das NP-Protein mit einem primären Antikörper detektiert, welcher eine 14 AS lange Sequenz erkennt, die im NP-Protein beider Hintergrundstämmen identisch ist. Das HA wurde mit den gleichen Primär-Antisera, die auch im SRID-Assay eingesetzt wurden, detektiert. Zur Visualisierung der antikörpermarkierten Proteine wurden zwei unterschiedliche IRDye-markierte sekundäre Antikörper derselben Spezies verwendet, die je nach Fluoreszenzfarbstoff bei Anregung mit einer Wellenlänge von 700 oder 800 nm eine Fluoreszenz emittieren. Die gemessene Intensität verhält sich hierbei proportional zur Menge der gebundenen sekundären Antikörper und konnte daher quantifiziert werden (siehe Abbildung 5-22).

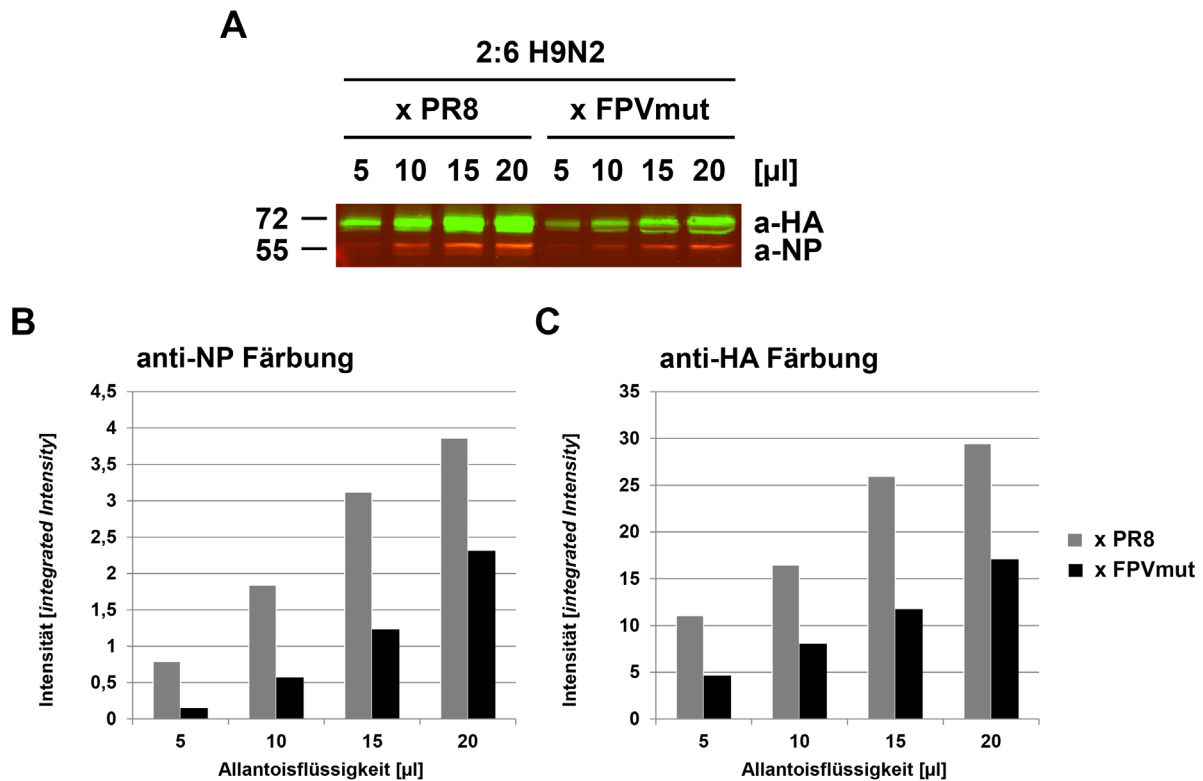


Abbildung 5-22 Exemplarische Darstellung eines Immunoblots zur Analyse des HA/NP Verhältnisses der rekombinanten Influenzaviren

(A) Immunoblot der H9N2 Doppel-Reassortanten, links im PR8 und rechts im FPVmut Hintergrund, der dritten Eipassage. Es wurden 5, 10, 15 und 20 μ l Allantoisflüssigkeit unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Das HA wurde mit einem Anti-HA Schaf-Serum und einem sekundären IRDye800-markierten im Esel generierten Antikörper (grün) detektiert. Das NP wurde mit einem Anti-NP Kaninchen-Antikörper detektiert und mit einem sekundären IRDye700-markierten Esel-Antikörper (rot) angefärbt. (B+C) Zeigt die Auswertung der im Odyssey Infrared Imaging System gemessenen Intensitäten des in A dargestellten Blots. Die grauen Balken repräsentieren die Werte für die PR8 Reassortanten und die schwarzen jene für die FPVmut Reassortanten, wobei jeweils die eingesetzte Probenmenge gegen die Intensität aufgetragen wurde.

Mit Hilfe des Immunoblots wurden zum einen die HA-Verhältnisse und zum anderen die Verhältnisse des HA zum NP der unterschiedlichen Akzeptorstämme verglichen (siehe Tabelle 9).

Bei der Charakterisierung der HA-Antigenmenge konnten die im SRID-Assay erhaltenen Ergebnisse für die H5N1-Reassortanten im Immunoblot bestätigt werden. Die Verwendung des FPVmut als Akzeptorstamm wirkt sich positiv auf den HA-Gehalt sowohl in den Doppel- als auch in den Triple-Reassortanten aus. Auch in den H9N2-Reassortanten konnten die im SRID-Assay gemessenen Ergebnisse bestätigt werden, da eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den errechneten Verhältnisfaktoren beider Methoden besteht. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den H1N1pdm09-Reassortanten, dass die mittels Immunoblot generierten Daten – mit Ausnahme der ersten Passage der Doppel-

Ergebnisse

Reassortanten – insgesamt einen verhältnismäßig höheren HA-Gehalt bei Verwendung des FPVmut-Akzeptorstammes gemessen wurde, hingegen das Verhältnis bei Analyse mit dem SRID-Assay entgegengesetzte Ergebnisse lieferte.

Bei der Charakterisierung der Reassortanten anhand des HA/NP-Verhältnisses, welches als Maß für die Inkorporation des HA-Proteins in die Virionen gewertet wurde, war mit wenigen Ausnahmen das HA/NP-Verhältnis der PR8-Reassortanten höher. Die analysierten Proben wurden nicht vor ihrer Auftrennung über einen Sucrose-Gradienten aufgereinigt, wodurch nicht gewährleistet werden kann, dass die quantifizierten Proteinen Partikel-assoziiert vorlagen. Es zeigte sich, dass insgesamt die im FPVmut-Hintergrund gemessenen NP-Mengen deutlich über denen des PR8-Akzeptorstammes und das Verhältnis zwischen FPVmut und PR8 verhältnismäßig deutlich höher als bei der Betrachtung der Verhältnisse nur zwischen den HA-Proteinen lag.

Tabelle 9: Gegenüberstellung der SRID und der Immunoblot Ergebnisse

Aufgeführt sind die Ergebnisse unterschiedlicher Passagen im Hühnerei. Das Verhältnis des HA-Gehaltes gemessen im SRID (erste Spalte) entspricht nicht den Verhältnissen der Mittelwerte der entsprechenden Eipassage, sondern den jeweiligen Einzelproben der Passage, die auch im Immunoblot untersucht wurden. Die zweite Spalte enthält die entsprechenden Ergebnisse, die mittels Immunoblot gemessen wurden und die letzte Spalte die Verhältnisse nach Bezug auf das parallel gemessene NP. Für die 3. und 5. Passage der 2:6 H5N1 Reassortanten wurden jeweils zwei Bestimmungen im Immunoblot durchgeführt.

Virus	Reassortante	Passage	Verhältnissfaktor FPV/PR8		
			SRID HA	Westernblot HA	HA/NP
H5N1	2:6	1	1,89	2,88	0,45
		3	1,92	2,50 / 2,09	1,09 / 1,25
		5	1,03	0,86 / 0,94	0,62 / 0,67
		10	0,80	1,06	0,58
	3:5	1	2,06	1,27	0,66
		2	2,40	2,07	0,91
		3	2,38	1,94	2,59
		5	2,32	1,38	0,36
	2:6	1	0,74	0,80	0,51
		3	0,51	0,47	1,29
H9N2	3:5	1	1,58	1,84	0,44
		3	1,48	1,57	0,44
	2:6	1	0,39	0,26	0,09
		10	0,79	1,24	0,12
	3:5	1	0,55	1,53	1,01
		5	0,96	1,31	0,28

5.4.1.4 Höhere HA-Ausbeute der H5N1-Reassortanten im FPVmut-Hintergrund im Zellkultursystem

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln gezeigt, konnte für die H5N1-Reassortanten ein eindeutiger quantitativer Vorteil in der HA-Ausbeute bei Verwendung des FPVmut-Akzeptorstammes nach Anzucht im Hühnerei-System bewiesen werden. Ergänzend sollte untersucht werden, ob dieser positive Einfluss des aviären FPVmut-Akzeptors auf den HA-Gehalt auch bei der Anzucht in den ebenfalls zur Impfstoffproduktion verwendeten Zelllinien MDCK und Vero auftritt.

Für diese Untersuchung wurden die MDCK-Zellen mit einer MOI von 10^{-4} und die weniger empfänglichen Vero-Zellen mit einer MOI von 10^{-1} in parallelen Ansätzen infiziert. Die HA-Menge im Kulturüberstand wurde über einen Zeitraum von 72 h in 12 h Intervallen mittels des mit Hühnererythrozyten bestimmten HA-Titers nachverfolgt. Zusätzlich wurde zu ausgewählten Zeitpunkten die absolute HA-Menge mittels des SRID-Assays quantifiziert.

Die Replikationseffizienz aller rekombinanten Viren in MDCK-Zellen wurde im Kapitel 5.3.1 anhand der Ermittlung des HA-Titers analysiert. In diesem Abschnitt wurde ergänzend auch die exakte Quantifizierung des HA-Antigens mithilfe des SRID-Assays zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten durchgeführt. Im Vergleich zu den im Kapitel 5.3.1 dargestellten Versuchen wurde eine zehnfach geringere Virusmenge eingesetzt. Zudem wurden für die Bestimmung des HA-Titers anstelle von Erythrozyten aus dem Meerschweinchen Hühnererythrozyten verwendet. Analog zur vorherigen Untersuchung zeigte sich erneut, dass die mit den Doppel-Reassortanten erzielten HA-Titer in beiden Hintergrundstämmen höher als jene der entsprechenden Triple-Reassortanten waren. Zu den frühen Zeitpunkten waren in Korrelation zu den vorherigen Ergebnissen die erzielten HA-Titer im FPVmut-Hintergrund, wie auch die des SRID-Assays, höher. 48 h nach der Infektion waren die mit den PR8-Reassortanten erzielten HA-Titer minimal höher und die SRID-Ergebnisse beider Akzeptorviren gleich, zu den späteren Zeitpunkten wurden mit dem PR8-Hintergrund jedoch bessere Ausbeuten erzielt (siehe Abbildung 5-23 A).

In den Vero-Zellen zeigte sich, dass für dieses Vermehrungssystem die FPVmut-Reassortanten den PR8-Reassortanten über den gesamten Zeitraum deutlich überlegen waren. Diese Beobachtung lässt sich sowohl anhand der Ergebnisse des HA-Tests als auch über die im SRID-Assay gemessene absolute HA-Menge belegen. Für den PR8-Akzeptorstamm und eingeschränkt gültig für das FPVmut lagen die mit den Doppel-Reassortanten erzielten HA-Antigenausbeuten höher (siehe Abbildung 5-23 B).

Wie diese Untersuchungen belegen, erwies sich die Verwendung des FPVmut für die H5N1-Reassortanten sowohl in den MDCK-Zellen zu den frühen Infektionszeitpunkten als auch in den Vero-Zellen als vorteilhaft für die Erzielung höherer HA-Antigenausbeuten.

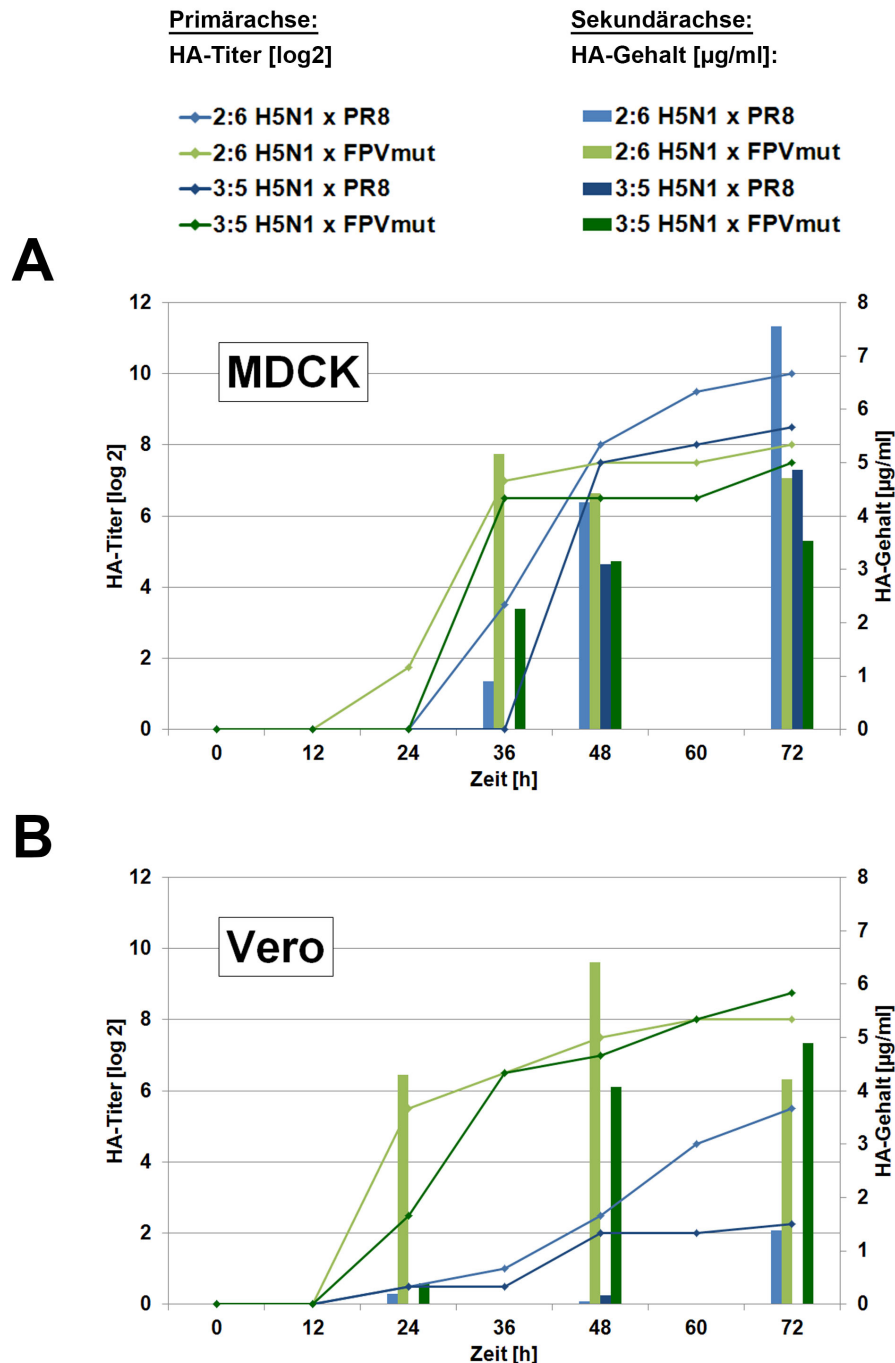


Abbildung 5-23 Zeitabhängige HA-Ausbeuten der H5N1-Reassortanten im Zellkultursystem

Dargestellt ist die zeitabhängige HA-Ausbeute der H5N1-Reassortanten im MDCK- und Vero-Zellsystem. Die aus einer Doppelbestimmung gemittelten Daten für die PR8 basierten Reassortanten sind in blau und die der FPVmut in grün abgebildet, wobei der hellere Farbton den Doppel- und der dunklere Farbton den Triple-Reassortanten entspricht. Auf der Primärachse sind die Bezüge für die HA-Titer (Liniendiagramm), auf der Sekundärachse die für die mit dem SRID-Assay gemessenen HA-Ausbeuten (Balkendiagramm) aufgeführt. (A) Ergebnisse der Infektion der MDCK-Zellen mit einer MOI von 10^{-4} und (B) Infektion der Vero-Zellen mit einer MOI von 10^{-1} .

5.4.2 Gleiche NA-Ausbeute in den rekombinanten Influenzaviren

Die Neuraminidase ist neben dem HA das zweite Hauptantigen der Influenzaviren. Antikörper, die gegen dieses Oberflächenprotein gerichtet sind, können die Initiation der Influenzainfektion vermutlich nicht verhindern, inhibieren aber die NA-Aktivität, wodurch eine weitere Ausbreitung der Viren im Wirt verhindert wird, sodass ein milderer Infektionsverlauf stattfindet [2;63;91-93]. In allen zurzeit in Deutschland zugelassenen saisonalen Influenza-Impfstoffen sind beide Oberflächenantigene enthalten. Zur Freigabe einer Impfstoffcharge muss das pharmazeutische Unternehmen für beide Proteine einen Identitätsnachweis erbringen, allerdings nur den enthaltenden HA-Gehalt nicht den der NA quantifizieren. Bisher ist also dem NA-Gehalt in Impfstoffen eher wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden. Es ist denkbar, dass die Neuraminidase zur Ausbildung einer möglichst umfangreichen und breiten Immunität für zukünftige Impfstoffentwicklungen zunehmende Bedeutung finden könnte.

Zum Vergleich des möglichen Einflusses unterschiedlicher Hintergrundstämme auf den Einbau der NA-Proteine in die Virionen der rekombinanten Influenzaviren wurde die enzymatische NA-Aktivität untersucht. Voraussetzung für diesen Ansatz war, dass die zu vergleichenden Viren jeweils das gleiche NA-Gen trugen, welches folglich eine identische enzymatische Aktivität besaß. Somit konnte diese als Indikator für den NA-Gehalt verwendet werden. Der Nachweis der NA-Aktivität erfolgte, indem die enzymatisch vom Glykoproteinsubstrat Fetuin abgespaltenen freien Sialinsäuren über eine photometrisch messbare Farbreaktion der Thiobarbitursäure quantifiziert wurden.

Die Bestimmung der NA-Aktivität wurde ausschließlich für die Reassortanten des pandemischen H1N1pdm09- sowie die potenziell pandemischen H5N1- und H9N2-Isolate durchgeführt. Bei den Doppel-Reassortanten wurden die erste und sechste Passage und bei den Triple-Reassortanten die erste und fünfte Ei-Passage untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die jeweiligen Reassortanten hierfür anhand der SRID-Assay Ergebnisse auf die gleiche HA-Menge eingestellt, wobei für die H5N1- und H9N2-Reassortanten ein Wert von 4 µg/ml und die H1N1pdm09 ein Wert von 3 µg/ml HA festgelegt wurde. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Viren (2^0 bis 2^7) hergestellt und die NA-Aktivität in zwei unabhängigen Experimenten jeweils in dreifacher Bestimmung ermittelt. Die anhand einer NA-freien Probe korrigierten, gemittelten Ergebnisse für die einzelnen Verdünnungsstufen sind in Abbildung 5-24 aufgeführt. Zusätzlich wurde eine kommerziell erhältliche Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (V.c.) mit bekannter enzymatischen Aktivität als Positivkontrolle mitgeführt.

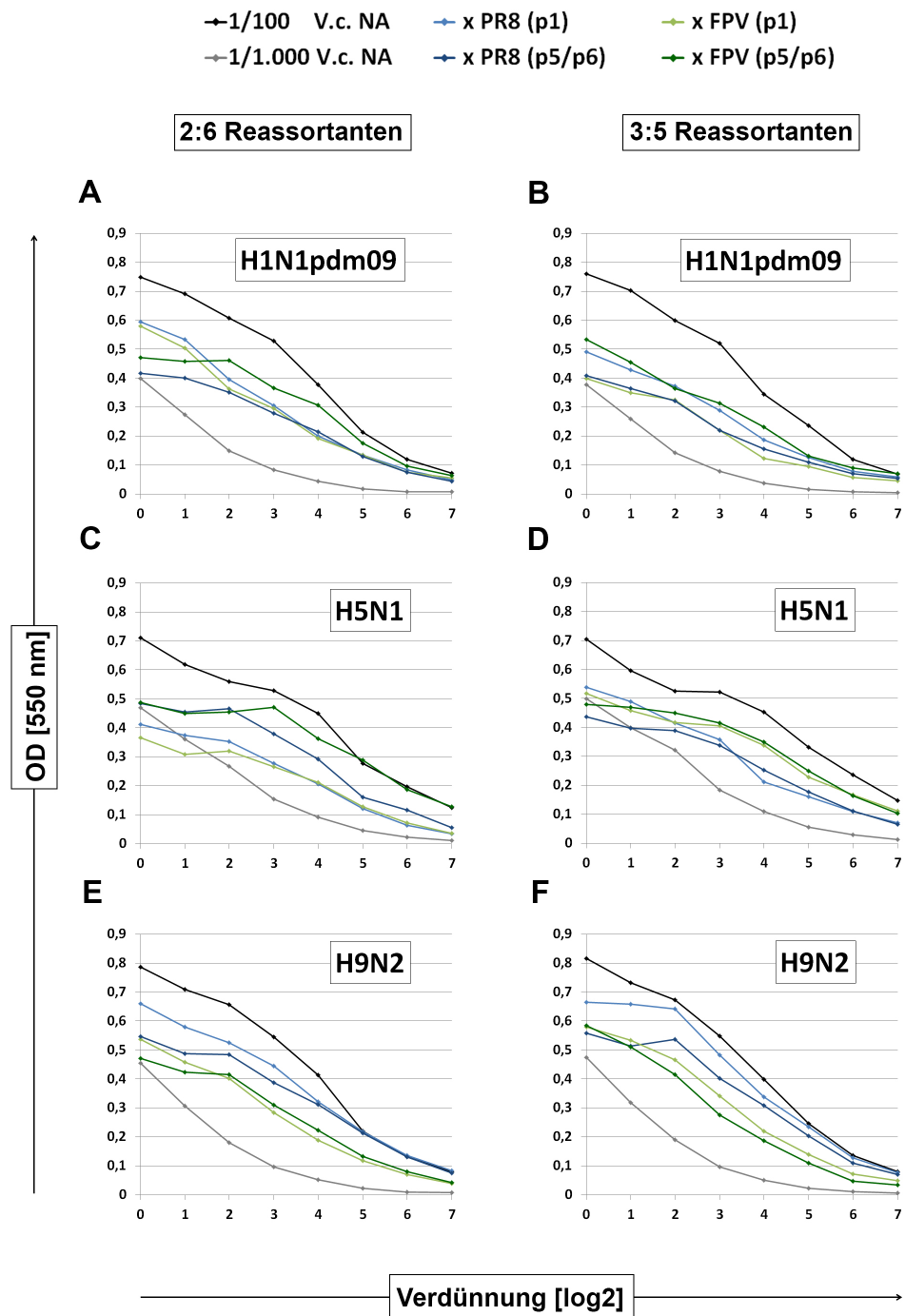


Abbildung 5-24 Photometrische Messdaten zum indirekten Nachweis der NA-Aktivität der H1N1pdm09-, H5N1- und H9N2-Reassortanten

Dargestellt sind die gemittelten OD-Werte der photometrisch messbaren Farbreaktion der TBA mit den durch die NA-Aktivität vom Fetuin abgespaltenen Sialinsäureresten. Aufgeführt sind die gemittelten Ergebnisse der unterschiedlichen Verdünnungsstufen aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils dreifacher Bestimmung. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse der Doppel-, auf der rechten Seite die Triple-Reassortanten dargestellt, wobei die Daten des PR8-Akzeptors blau und die des FPVmut grün abgebildet sind. Die Werte der ersten Passage (p) sind in einem helleren und die der späteren Passage (5. bei Triple- bzw. 6. bei Doppel-Reassortanten) in einem dunkleren Farbton aufgeführt. Die als Vergleichsstandard mitgeführte, kommerziell erhältliche Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (V.c.) wurde 1/100 bzw. 1/1.000 verdünnt (schwarz/grau). (A+B) H1N1pdm09-, (C+D) H5N1- und (E+F) H9N2-Reassortanten.

Die in Abbildung 5-24 dargestellten photometrischen Messwerte zum Nachweis der NA-Aktivität der Reassortanten wurden, um die interexperimentellen Variationen zu berücksichtigen, über die in jedem Experiment mitgeführte V.c. NA normalisiert. Hierzu wurden zunächst die Ergebnisse der Verdünnungsstufen jeweils einzeln ins Verhältnis zu den Ergebnissen der beiden eingesetzten V.c. NA Konzentrationen gesetzt, anschließend wurden pro Referenzkonzentration der V.c. NA unabhängige Mittelwerte erhoben. Für diese Mittelwerte wurde das Verhältnis der jeweiligen FPVmut- und PR8-Reassortanten ermittelt, um aus den Zwischenergebnissen beider Einzelkonzentrationen einen einzigen Mittelwert zu berechnen. Die auf diesen Weg festgelegten Verhältnisse sind in Abbildung 5-25 dargestellt.

Bei den untersuchten H1N1pdm09-Reassortanten zeigte sich in den späteren Ei-Passagen eine Tendenz zu einer höheren NA-Aktivität im FPVmut-Hintergrundstamm. Der Vergleich zwischen den Hintergrundstämmen ergab für die frühen Passagen Verhältnisse von $0,95 \pm 0,18$ für die Doppel-Reassortanten und $0,79 \pm 0,11$ für die Triple-Reassortanten, für die späteren Passagen $1,36 \pm 0,4$ bzw. $1,29 \pm 0,21$. Mit dem H5N1-Isolat konnten für alle FPVmut-Reassortanten höhere NA-Aktivitätswerte gemessen werden, wobei für die Doppel-Reassortanten Verhältnisse von $1,09 \pm 0,23$ für die frühe und $1,53 \pm 0,57$ für die späte Passage sowie bei den Triple-Reassortanten $1,35 \pm 0,19$ bzw. $1,39 \pm 0,18$ ermittelt wurden.

Alle H9N2-Reassortanten wiesen hingegen eine geringere NA-Aktivität im FPVmut-Hintergrund auf. Hierbei wurden für die Doppel-Reassortanten Verhältnisse in der frühen Passage von $0,6 \pm 0,08$ und der späten von $0,72 \pm 0,21$ sowie für die Triple-Reassortanten von $0,67 \pm 0,11$ bzw. $0,62 \pm 0,01$ ermittelt.

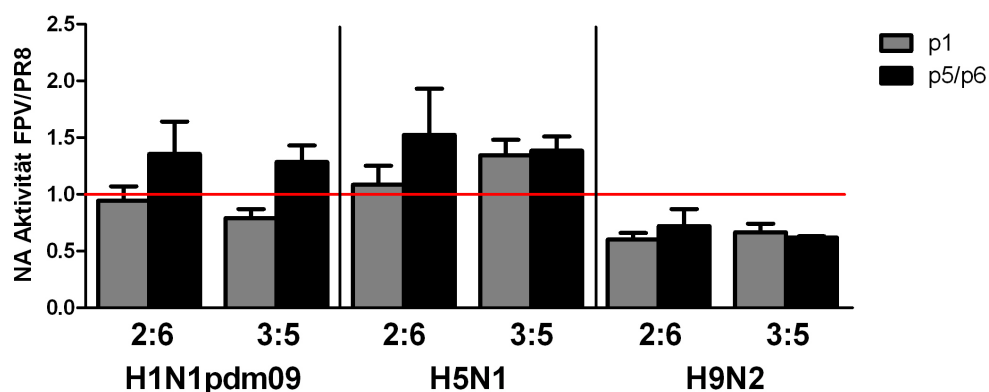


Abbildung 5-25 Verhältnisse der NA-Aktivität zwischen den FPVmut- und den PR8-Reassortanten der H1N1pdm09-, H5N1- und H9N2-Isolate

Dargestellt sind die Verhältnisse der ermittelten NA-Aktivitätsmessungen zwischen den FPVmut- und den PR8-Reassortanten aus zwei unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils die Viren aus der ersten Passage (p) im Ei, bei den Doppel-Reassortanten die 6. sowie bei den Triple die 5. Passage untersucht. Ein Wert über 1.0 (rote Linie) kennzeichnet eine höhere NA-Aktivität im FPVmut-Hintergrund und *vice versa*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Diese Ergebnisse belegen, dass die beiden verwendeten Hintergrundstämme sowie die unterschiedliche genetische Zusammensetzung der Doppel- und Triple-Reassortanten keinen entscheidenden Einfluss auf die Integration der NA-Proteine, gemessen anhand der NA-Aktivität, nehmen. Für das aviäre H9N2 ist die nachgewiesene NA-Aktivität im FPVmut-Hintergrund etwas geringer als im PR8. Bei den H1N1pdm09-Reassortanten konnte in der späteren Passage und bei den H5N1-Reassortanten insgesamt eine unwesentlich höhere NA-Aktivität in beiden genetischen Konstellationen nachgewiesen werden.

5.5 Morphologie der rekombinanten Influenzaviren

In der Struktur der Virionen könnten infolge des Austausches des Hintergrundstammes oder des an der Morphogenese beteiligten M1-Proteins [4;154;155] Veränderungen auftreten. Die unterschiedlichen genetischen Akzeptorstämme könnten aber auch Eigenschaften wie das Aggregationsverhalten der Partikel oder den HA- und NA-Spikebesatz der Oberfläche beeinflussen. Um solche potenziellen Auswirkungen zu prüfen, wurde die Virusmorphologie der rekombinanten Viren mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie für beide Akzeptorstämme sowie für die H5N1-Doppel- und Triple-Reassortanten in beiden Akzeptorstämmen dargestellt. Die gezeigten Viren wurden zuvor einmal im Hühnerei passagiert, mittels Formaldehyd vollständig inaktiviert und anschließend mit Uranylacetat negativkontrastiert.

Zwischen den beiden verwendeten Akzeptorstämmen konnte kein signifikanter morphologischer Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 5-26). Bei beiden Isolaten wurden überwiegend sphärische, aber auch einige filamentöse Viren beobachtet (A+B). Ebenso waren mit dieser Methodik keine signifikanten Unterschiede in der Anordnung der Proteinspikes zu erkennen (C+D).

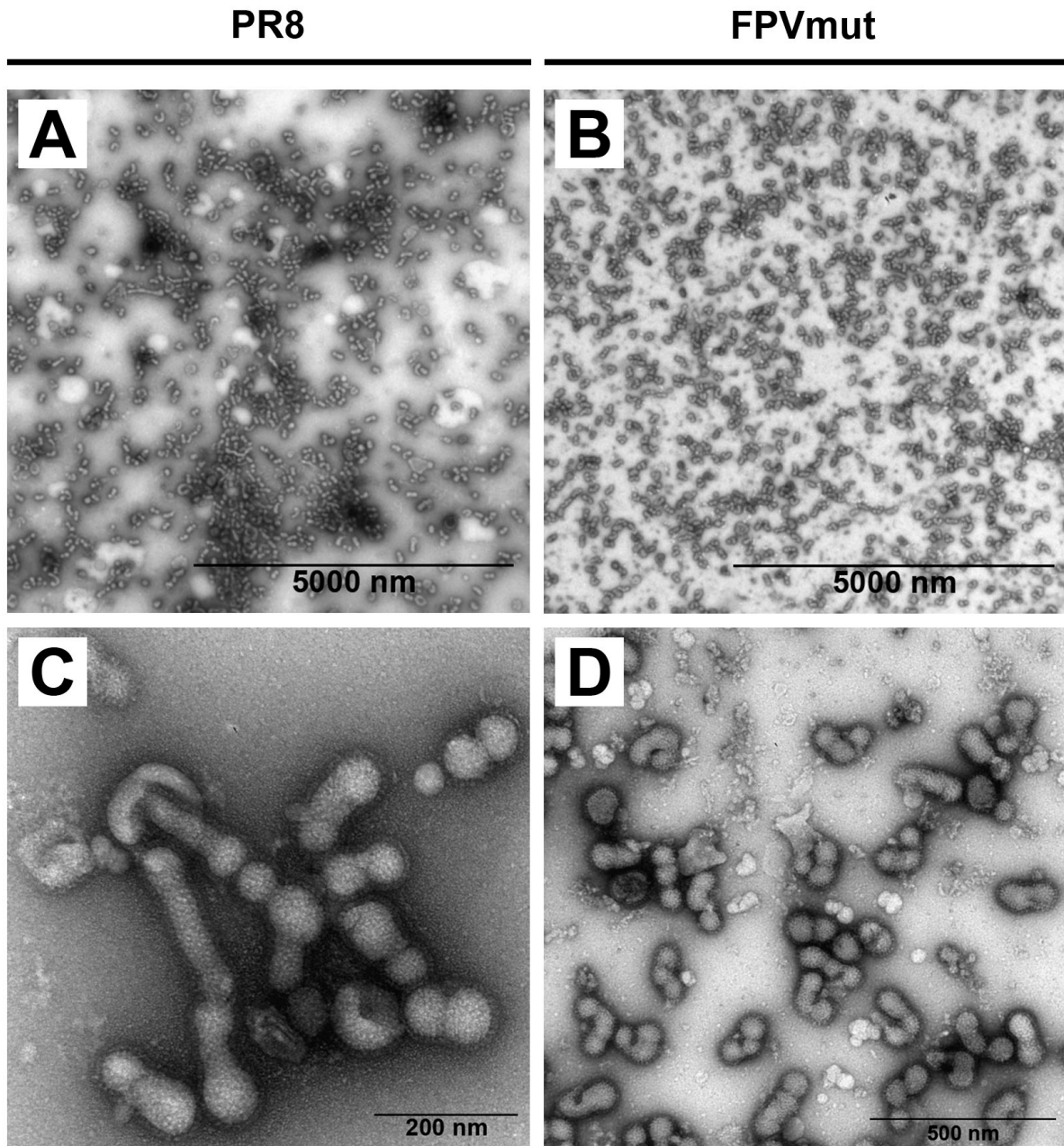


Abbildung 5-26 Morphologie der Akzeptorstämme

Die dargestellten Viren wurden einmal in Hühnereiern vermehrt, über einen Dichtegradienten separiert und um den Faktor 200 angereichert. Anschließend wurden die Viren mittels Formaldehyd inaktiviert und mit Uranylacetat kontrastiert. Die Bilder wurden mit dem Elektronenmikroskop EM 109 von Frau Eberle aus dem Fachgebiet Morphologie des Paul-Ehrlich-Institutes angefertigt. (A+C) PR8, Übersichtsaufnahme bei 3.000 facher und Ausschnittsvergrößerung bei 50.000 facher Vergrößerung. (B+D) FPVmut, Übersichtsaufnahme bei 3.000 facher und Nahaufnahme bei 30.000 facher Vergrößerung.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die H5N1-Reassortanten gemacht. Es ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Partikelform, dem Aggregationsverhalten oder dem Spikebesatz feststellen, weder zwischen den beiden Hintergrundstämmen

innerhalb der Doppel-Reassortanten (siehe Abbildung 5-27), noch nach dem Einbringen des homologen M-Gensegmentes aus dem H5N1-Isolat (siehe Abbildung 5-28).

H5N1-Doppel-Reassortanten

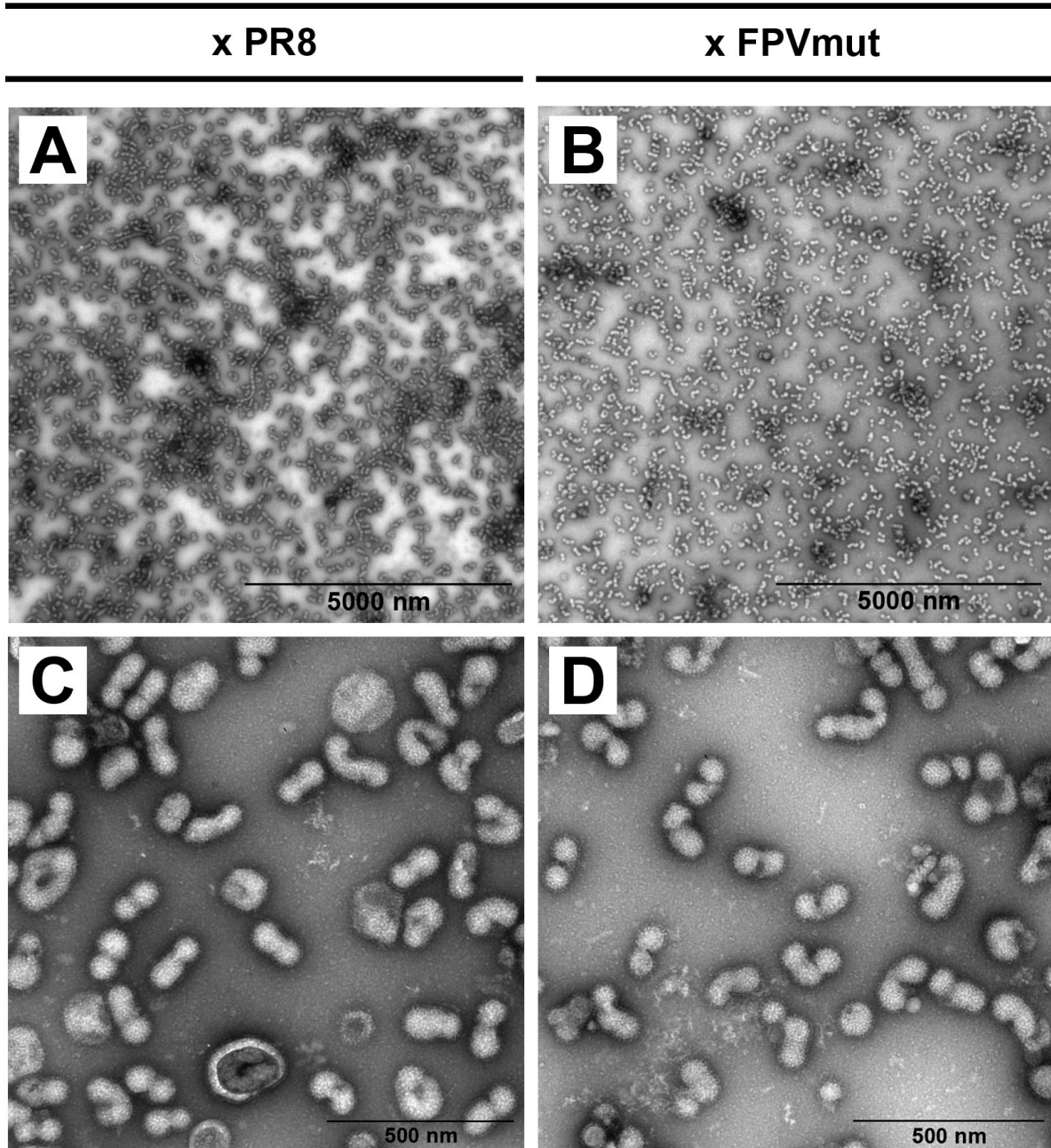


Abbildung 5-27 Morphologie der H5N1-Doppel-Reassortanten

(A+C) H5N1-Doppel-Reassortanten im PR8-Hintergrund, (B+D) H5N1-Doppel-Reassortanten im FPVmut-Hintergrund, Übersichtsaufnahmen bei 3.000 facher und die Ausschnittsvergrößerungen bei 30.000 facher Vergrößerung. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Bildlegende bei Abbildung 5-26.

H5N1-Triple-Reassortanten

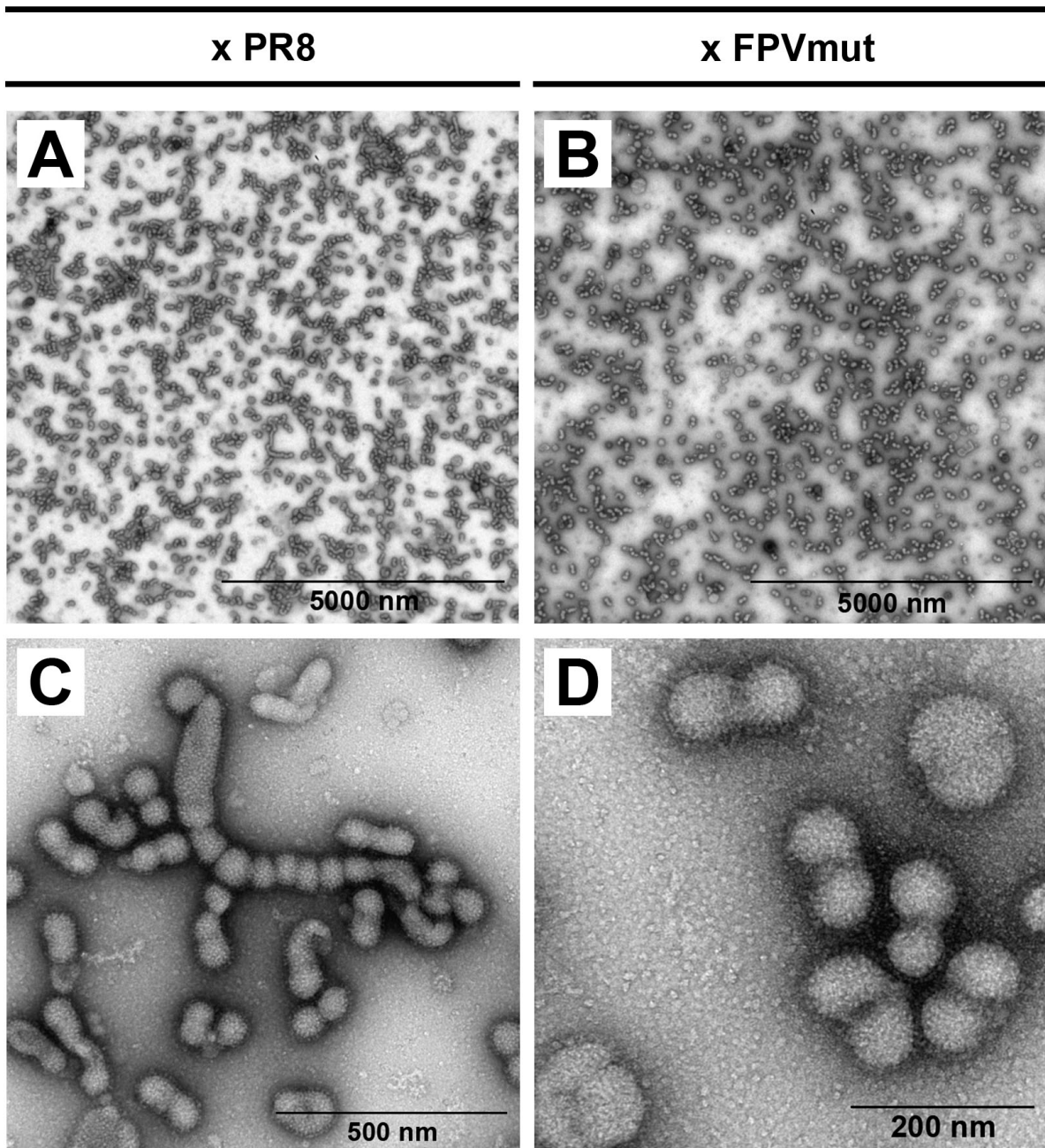


Abbildung 5-28 Morphologie der H5N1-Triple-Reassortanten

(A+C) H5N1-Triple-Reassortanten im PR8-Hintergrund, Übersichtsaufnahme bei 3.000 facher und Ausschnittsvergrößerung bei 30.000 facher Vergrößerung. (B+D) H5N1-Triple-Reassortanten im FPVmut-Hintergrund, Übersichtsaufnahme bei 3.000 facher Vergrößerung und Nahaufnahme bei 50.000 facher Vergrößerung. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Bildlegende bei Abbildung 5-26.

Ebenso wurden auch die Reassortanten des H9N2- und des H1N1pdm09-Isolates untersucht. Die Beobachtungen deckten sich hierbei mit jenen, die für die H5N1-Reassortanten gemacht wurden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte insgesamt in den hier

untersuchten Reassortanten kein Einfluss der unterschiedlichen Akzeptorstämme auf die Virusmorphologie festgestellt werden, ebenso ist die Herkunft des M1-Proteins unerheblich.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobene Datenlage belegt eindeutig, dass die Verwendung des FPVmut als Akzeptorstamm insbesondere für das potenziell pandemische H5N1 dem Standard PR8-System überlegen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die H5N1-Reassortanten im FPVmut-Hintergrund neben einer gesteigerten Ausbreitungsgeschwindigkeit in MDCK-Zellen auch teils deutlich gesteigerte HA- und geringfügig höhere NA-Antigenausbeuten im Hühnerei erzielten. Nicht nur im Hühnerei-Vermehrungssystem waren die H5N1-Reassortanten im aviären FPVmut-Hintergrundstamm den Reassortanten im humanen PR8-Stamm überlegen, dies galt auch bei der Vermehrung im Zellsystem. Die Daten zeigen einen nachweisbaren Replikationsvorteil zu den frühen Infektionszeitpunkten in MDCK-Zellen sowie eine insgesamt deutlich gesteigerte Antigenausbeute in der ebenfalls für die Influenzaimpfstoffproduktion verwendeten Vero-Zelllinie. Für das zweite aviäre, potenziell pandemische H9N2-Isolat konnte ebenfalls eine höhere Ausbreitungsgeschwindigkeit in MDCK-Zellen im FPVmut-Hintergrund gegenüber dem PR8-Akzeptorstamm nachgewiesen werden. Insbesondere wurde deutlich, dass sich in diesem Fall die Integration des homologen M-Gensegmentes positiv auf die HA-Antigenausbeute bei den FPVmut-Reassortanten auswirkte.

Auch für das H1N1pdm09-Isolat ließ sich ein positiver Einfluss auf die HA-Ausbeute beim Einbringen des isolatspezifischen M-Gensegmentes nachweisen. In diesem Fall waren jedoch die zur Erzeugung von Impfstoffsaatviren standardmäßig eingesetzten PR8-Doppel-Reassortanten insgesamt den FPVmut-Reassortanten überlegen. Für die humanen saisonalen H1N1- und H3N2-Isolate konnte durch die Verwendung des FPVmut-Hintergrundstammes keine Steigerung der HA-Antigenausbeuten gegenüber dem PR8-Akzeptor erzielt werden.

Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass gerade bei den aviären Isolaten die Verwendung des aviären Hintergrundstammes von Vorteil war. In der Regel werden Pandemien durch neue, zuvor noch nicht in der humanen Population vorgekommene, aviäre Influenzaviren ausgelöst. Gerade für ein solches Szenario, indem eine immunologisch naive Bevölkerung für einen neuartigen Subtyp grundimmunisiert werden muss, werden größere Mengen an Impfantigen benötigt und die Verwendung des aviären FPVmut-Akzeptorstammes könnte einen großen Vorteil bringen.

6 Diskussion

6.1 Ansätze zur Verbesserung der Antigenausbeute für die Influenzaimpfstoffproduktion

Im Jahr 2006 verabschiedete die WHO einen Aktionsplan zur Verbesserung der globalen Versorgung mit saisonalen und pandemischen Influenzaimpfstoffen (*global action plan*=GAP) [156-158]. Eines der hierin beschriebenen Ziele ist die Steigerung der Herstellungskapazitäten durch den Aus- und Neubau von Produktionsstätten sowie durch die Entwicklung neuer, ertragreicherer Impfstoffe [159]. Retrospektive zeigte sich für die H1N1-Pandemie im Jahr 2009, dass nur 28 % der im GAP festgelegten, benötigten pandemischen Impfstoffdosen produziert werden konnten, u. a. aufgrund der um ein Drittel reduzierten Antigenausbeute mit dem H1N1pdm09-Isolat im Vergleich zu den üblichen Mengen während der saisonalen Impfstoffproduktion [160]. Der Suche nach praktikablen Möglichkeiten zur Optimierung produktionsrelevanter Faktoren zur Steigerung der Antigenausbeute kommt vor diesem Hintergrund eine zentrale Bedeutung zu.

Um die Impfstoffversorgung der Bevölkerung gewährleisten zu können, muss eine ausreichende Verfügbarkeit an Influenzaimpfstoffdosen sichergestellt werden. Zur Steigerung der Impfstoffproduktion eignen sich schnell wirksame Faktoren wie die Auswahl möglichst ertragreicher Impfstoffsaatvirus-Reassortanten, die generelle Auswahl des Produktionssystems (z.B. Zellkultur, Hühnereier oder rekombinante Expression der Antigene) und die Optimierung der Produktionsprozessschritte (z.B. Temperatur, Infektionsinokulum und Inkubationszeit). Zusätzlich kann durch den Einsatz von Adjuvanzen die pro Impfdosis benötigte Antigenmenge verringert werden [161], woraus eine insgesamt höhere Gesamtanzahl an herstellbaren Impfstoffdosen resultiert. Längerfristige Ziele sind die Entwicklungen neuartiger Adjuvanzen und verbesserter Impfstoffe, die eine Schutzwirkung auch vor Driftvarianten oder bestenfalls heterologen Subtypen gewährleisten könnten.

Der Ansatzpunkt dieser Arbeit zur Erhöhung der produzierbaren Antigenausbeute sieht vor die Eignung der aviären apathogenen Mutante FPVmut als alternativen Akzeptorstamm für die Generierung der Impfstoffsaatviren zu untersuchen. Zusätzlich sollte der Einfluss durch die Inkorporation des homologen M-Gensegmentes des Impfstoffkandidaten auf die erreichbare Antigenmenge als alternative genetische Zusammensetzung im Vergleich zu den klassischen Saatviren charakterisiert werden.

6.1.1 Das Potenzial des aviären FPVmut als alternativer Akzeptorstamm

Die Herstellung der Impfstoffsaatviren für die inaktivierten, saisonalen Impfstoffe erfolgt standardmäßig durch die Reassortierung der zirkulierenden Impfkandidaten mit dem humanen Isolat A/Puerto Rico/1934 (PR8) des Subtyps H1N1 [102] (für eine detailliertere Beschreibung siehe Einleitung Kapitel 2.2.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential des FPVmut als alternativer, neuer Impfstoffsaatvirus-Akzeptorstamm untersucht. Das FPVmut ist eine attenuierte Variante des aviären, hochpathogenen, etablierten Laborstamm A/Huhn/Rostock/1934 (FPV=*fowl plague virus*) des Subtyps H7N1 [83], der sich durch die Erzielung sehr hoher Antigenausbeuten bei Anzucht im embryonierten Hühnerei auszeichnet. Darüber hinaus wurde dieses Isolat bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts isoliert und seitdem an die unterschiedlichsten Zelllinien adaptiert, insbesondere auch jene, die für die Influenzaimpfstoffproduktion eine zunehmend größere Bedeutung gewinnen (z.B. MDCK- und Vero-Zellen). Da die Impfstoffdonorviren insbesondere im Pandemie-Fall häufig aviären Ursprunges sind, könnte der Einsatz des aviären FPVmut-Akzeptorstammes zur Generierung der Impfstoffsaatviren durch eine optimierte genetische Kompatibilität zwischen den Oberflächenproteinen und den internen Genen die Ausbeute an produzierbarer Gesamtantigenmenge steigern.

Die Verwendbarkeit eines Influenzavirus als Akzeptorstamm für die Bildung von Impfstoffsaatviren und der Einsatz der mit ihm gebildeten Reassortanten im Produktionsmaßstab sind an unterschiedliche Bedingungen geknüpft. Hochpathogene Viren können in aller Regel aus sicherheitstechnischen Gründen und aufgrund der Embryoletalität bei der Herstellung der Impfstoffe im Hühnerei nicht eingesetzt werden [162]. Das FPVmut weist sowohl in MDCK-Zellen als auch im aviären System den benötigten niedrigpathogenen Phänotyp auf [83]. Ebenso repliziert es auch in Vero-Zellen, einem weiteren in der Influenzaimpfstoffproduktion verwendeten Zellsystem sowie in humanen A549-Lungenepithelzellen ausschließlich in Abhängigkeit von Trypsin, wodurch der niedrigpathogene Charakter der Viren in Zellkultur nachgewiesen wird (siehe 5.1.1). Die zweite wichtige Voraussetzung für die Produktion ist das Erreichen hoher Antigenausbeuten in den unterschiedlichen zur Impfstoffproduktion eingesetzten Vermehrungssystemen. Bezüglich ihrer Eignung als Akzeptorstämme zeichnen sich die beiden Isolate FPVmut und PR8 durch ein identisch gutes Replikationsverhalten in drei der standardmäßig in der Impfstoffproduktion eingesetzten Vermehrungssystemen aus (siehe 5.1.2). Neben diesen zwei Punkten ist es zusätzlich notwendig, dass sich der Akzeptorstamm zur Generierung von rekombinanten Viren eignet. Zur Überprüfung der Nutzbarkeit als Hintergrundstamm wurde parallel mit dem PR8 und dem FPVmut mittels des Reversen-Genetik-Systems

unterschiedliche Reassortanten generiert. Hierbei dienten ein pandemisches H1N1pdm09-Isolat („Schweinegrippe“), potenziell pandemische aviäre H5N1- („Vogelgrippe“) und H9N2-Isolate sowie humane saisonale H1N1- und H3N2-Vakzinestämme als Donorviren für die Oberflächenproteine HA und NA (Doppel-Reassortanten) bzw. für das HA-, das NA- und das M-Gensegment (Triple-Reassortanten). Es konnte gezeigt werden, dass sich beide unterschiedlichen Hintergrundstämme gleichwertig für die Bildung der verschiedenen rekombinanten Viren eignen, da mit beiden Akzeptorstämmen im gleichen Zeitrahmen ein identischer Satz von Reassortanten durch die Plasmid-Transfektion erzeugt werden konnte (siehe 5.2).

In der Vergangenheit wurde wiederholt bei saisonalen und insbesondere auch bei pandemischen Isolaten beobachtet, dass nicht alle zirkulierenden Viren gleichermaßen mit dem Standard-Akzeptorstamm geeignete Impfstoffsaatviren ausbilden. Exemplarisch hierfür zeigte sich bei der Entwicklung eines H5-spezifischen Impfstoffes, dass durch die Reassortierung von A/Ente/Singapur/1997 (H5N3) mit dem PR8 kein Saatvirus mit guten Replikationseigenschaften generiert werden konnte [163;164] und generell die produzierbare H5-Antigenmenge deutlich geringer ausfällt als im Zuge der Produktion saisonaler Impfstoffe [165]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Verwendung des aviären FPVmut als Akzeptorstamm für die Reassortierung des hier verwendeten potenziell pandemischen H5N1-Isolats zu einer deutlichen Steigerung der erzielbaren HA-Antigenausbeute im Vergleich zum PR8 *in ovo* führte (siehe 5.4.1.1 und 5.4.1.2). Dieser durch die Verwendung des aviären Hintergrundstammes induzierte Effekt der Steigerung der produzierbaren Antigenmenge war noch signifikanter ausgeprägt bei der Vermehrung in Vero-Zellen (siehe 5.4.1.4), was vor dem Hintergrund der zunehmenden Entwicklung der Produktion von Influenzaimpfstoffen auch in Zellkultursystemen eine wichtige Beobachtung darstellt. Abweichend von der hier festgestellten vorteilhaften Auswirkung des aviären Hintergrundstammes für die Ausbeute der H5-Antigenmenge beschrieben Horimoto *et al.*, dass die mit dem PR8 gebildete H5-Reassortanten höhere Titer erzeugten als jene Viren, bei denen das aviäre A/Schwan/Shimane/499/83 (H5N3) Isolat als Akzeptorstamm eingesetzt wurde [166]. Diese divergenten Ergebnisse bezüglich des Vorteils eines aviären Hintergrundstammes für die H5-Antigenproduktion lassen sich vermutlich auf die unterschiedlichen Akzeptorstamm-Isolate zurückführen. Das FPVmut leitet sich von einem aus einem Huhn isolierten hochpathogenen Virus ab, wohingegen das A/Schwan/Shimane/499/83 (H5N3) Isolat niedrigpathogen ist. Die Ursache der unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der erzielbaren Antigenausbeute liegt somit möglicherweise in den verschiedenen genetischen Eigenschaften der internen Gene. Die

Ergebnisse dieser Arbeit belegen aber eindeutig, dass bei Verwendung des aviären FPVmut gegenüber dem PR8 eine höhere Antigenmenge für das H5N1-Donorvirus erzielt wurde und sich somit für diesen speziellen Fall das FPVmut als eine sinnvolle, leistungsfähigere Alternative zu dem PR8-Standardsystem erwiesen hat.

6.1.2 Eignung von Triple-Reassortanten als Impfstoffsaatviren

Ein weiterer Ansatz, der ergänzend ausführlich untersucht wurde, war der Versuch die produzierbare Antigenmenge durch eine alternative genetische Zusammensetzung der Impfstoffsaatvirus-Reassortanten zu erhöhen. Die rekombinanten Saatviren können generell mittels zweier unterschiedlicher Methoden generiert werden: dem in der Einleitung detailliert beschriebenen Reversen-Genetik-System, bei dem vorab anhand der eingesetzten Plasmide die genetische Zusammensetzung der Saatviren festgelegt wird (siehe Kapitel 2.1.6) oder durch die routinemäßig eingesetzte klassische Reassortierung in Folge einer parallelen Infektion mit zwei unterschiedlichen Viren [102], bei der keine feste Genkonstellationen der Nachkommenviren vorhersagbar ist. Im letzteren Fall wird die heterogene Viruspopulation anschließend durch Einsatz spezifischer Antiseren auf das Vorhandensein beider gewünschten antigenen Oberflächenproteine des zirkulierenden Influenzaisolates selektioniert. Werden die restlichen sechs Gensegmente durch den PR8-Akzeptorstamm bereitgestellt, entstehen hierbei Doppel-Reassortanten (2:6). Neben dieser klassischen 2:6 Impfstoffsaatvirus-Zusammensetzung könnte sich allerdings auch die Inkorporation weitere Gensegmente des Vakzine-Isolats als vorteilhaft für die Antigenausbeute auswirken. Ein interessanter Kandidat für diese Untersuchungen ist das M-Gensegment, da das M1-Protein in viele entscheidende Schlüsselprozesse in der Virusbildung involviert ist, wie z.B. der Virus-Assemblierung, der Abknospung neu synthetisierter Viren sowie der Vermittlerfunktion zwischen den RNPs und den cytoplasmatischen Abschnitten der Oberflächenproteine [11-13;167]. Aufgrund der vielfältigen Interaktionen mit bei der Virusreifung beteiligten Proteinen sollte der mögliche Vorteil durch die Bereitstellung des zu den eingebrachten Oberflächenproteinen homologen M-Gensegmentes durch die Herstellung von Triple-Reassortanten (3:5) und deren Analyse untersucht werden.

6.1.2.1 Rekombinationsmöglichkeiten des M-Gensegmentes

Die Möglichkeit der unabhängigen Rekombination zwischen dem M-Gensegment und den beiden Oberflächenproteinen wurde bereits 1979 anhand der Analyse der genetischen Zusammensetzung von 40 PR8-Reassortanten mit einem humanen H3N2-Isolat beschrieben. In 65 % der Viren komigrierte das M-Gensegment aus dem PR8-Isolat in unterschiedlichen Kombination mit den beiden Oberflächenproteinen der beiden

Rekombinationspartner [168]. Zwei Jahre davor wurde für das aviäre FPV-Isolat beobachtet, dass sich mittels der klassischen Reassortierung keine rekombinanten Viren generieren ließen, bei denen das HA-Gen aus dem FPV-Isolat zusammen mit dem M-Gensegment aus einem humanen Isolat nachzuweisen war [169]. Die gleiche Methode eignet sich hingegen um Reassortanten zu erzeugen, bei denen die HA-Gensegmente aus unterschiedlichen aviären Isolaten gemeinsam mit dem M-Segment aus FPV kombiniert wurden und *vice versa* [170]. Nichtsdestotrotz konnte auch bei der Rekombination zwischen zwei aviären Isolaten eine deutliche Präferenz für die gemeinsame Rekombination des HA-Gensegmentes zusammen mit dem homologen M-Gensegment beobachtet werden [171]. Neben den aviären und den humanen Influenzaviren weisen auch die equinen Influenza-A-Viren eine scheinbare funktionelle Assoziation zwischen dem HA- und dem M-Gensegment auf. Im Rahmen einer phylogenetischen Untersuchung wurde beobachtet, dass mit Ausnahme des M-Gensegmentes alle internen Gene der equinen H7N7 Linie 1 durch die der equinen H3N8 Linie 2 ersetzt wurden [172]. Diese Befunde belegen, dass die freie Kombination der Gene für die Oberflächenproteine und dem M-Gensegment innerhalb von Viren aus einer Spezies möglich ist, es aber zu Einschränkungen bei der Kombination zwischen Viren aus unterschiedlichen Spezies kommt und auch innerhalb einer Spezies das HA-Gensegment bevorzugt mit dem homologen M-Gensegment komigriert. Diese Inkompatibilität des M-Gensegmentes mit den internen Genen zwischen Influenzaviren aus verschiedenen Wirten ist jedoch keineswegs absolut, da sehr wohl Reassortanten mit einem aviären M-Gensegment im humanen Hintergrund generiert werden können, diese weisen aber gegebenenfalls *in vivo* eine deutliche Reduktion der Replikation auf [173;174].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit dem Reversen-Genetik-System möglich ist Reassortanten herzustellen, bei denen ein aviäres M-Gensegment mit humanen Oberflächenproteinen kombiniert wurden (z.B. 2:6 H3N2 x FPVmut) und in umgekehrter Verknüpfung (z.B. 2:6 H9N2 x PR8). Es wurde hingegen nicht die Herstellbarkeit von Reassortanten untersucht, bei denen ausschließlich das M-Gensegment aus einer anderen Spezies abstammte. Bei der Erzeugung der Viren (siehe 5.2.1) zeigte sich, dass die Triple-Reassortante des saisonalen H1N1-Vakzine-Isolates das einzige Virus war, das sich nicht generieren ließ. Die Sequenz des klonierten M-Gensegmentes des A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) ist mit Ausnahme einer stillen Mutation in der zweiten Aminosäure identisch mit der bei NCBI veröffentlichten (Accession Nr. CY031341). Das M-Gensegment kodiert neben dem M1-Genprodukt zusätzlich für das durch Spleißen der mRNA entstehende M2-Protein. Der stattgefunden Basenaustausch befindet sich nicht in einem Bereich wichtiger regulatorischer Elemente des Spleißvorganges, wodurch die

Ursache für die nicht erfolgreiche Herstellung der Triple-Reassortanten nicht auf eine Beeinträchtigung des Spleißvorgangs und einer damit einhergehenden gestörten Bildung des M2-Proteins zurückgeführt werden kann. Die Triple-Reassortanten des saisonalen H1N1-Isolates konnten weder im aviären FPVmut- noch im humanen PR8-Hintergrund erzeugt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt steht nicht fest ob eine mögliche genetische Inkompatibilität des M-Gensegmentes mit den internen Segmenten beider Hintergrundstämme oder eine andere Ursache der Grund für die nicht Erzeugbarkeit dieser Triple-Reassortanten ist. Zur Klärung dieser Frage müssten weitere Untersuchungen stattfinden.

6.1.2.2 Einfluss des homologen M-Gensegmentes auf die Antigenausbeute

Studien zur Erfassung der genetischen Zusammensetzung der in der saisonalen Impfstoffproduktion eingesetzten klassisch erzeugten Reassortanten im PR8-Hintergrund ergaben, dass nur 31-56 % der Viren der 2:6 Konstellation entsprachen und das M-Gensegment nur sehr selten – in 3,5-7,6 % der Fälle – und ausschließlich in H3N2-Viren komigrierte [175;176].

Auch im Rahmen dieser Arbeit offenbarte sich kein offensichtlicher Vorteil durch die Integration des homologen M-Gensegmentes im Falle der mit den saisonalen Vakzinestämmen hergestellten Reassortanten. Der Einfluss des homologen M-Gensegments auf die Antigenausbeute für das saisonale H1N1-Isolat konnte nicht untersucht werden, da diese Triple-Reassortante nicht erzeugt werden konnte (siehe 5.2.1). Bei dem H3N2-Isolat wurden mit den Doppel- und Triple-Reassortanten im PR8-Hintergrund identische maximale HA-Titer erhalten (siehe 5.4.1.1), im SRID-Assay hingegen fielen die Durchschnittswerte der HA-Antigenausbeuten bei der 2:6 Konstellation etwas höher als jene der 3:5 Konstellation aus, wodurch sich für diesen Subtyp die Integration des M-Gensegmentes im PR8-Hintergrund nicht direkt positiv auswirkte. Es ist allerdings für das M-Gensegment des PR8-Isolates beschrieben, dass dieses verantwortlich für den Erhalt guter Virusaussbeuten ist [102;103;177;178] und dieser Einfluss könnte einen größeren Vorteil darstellen als die optimierte genetische Konstellation in Folge der Integration des homologen M-Gensegmentes. Unabhängig von diesem beschriebenen positiven Einfluss des M-Gensegmentes des PR8-Isolates auf die Virusaussbeute konnte der Effekt des H3N2 homologen M-Gensegmentes im FPVmut-Hintergrund untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die höchsten absoluten Werte des HA-Antigengehalts im SRID-Assay innerhalb des FPVmut-Hintergrunds mit einer Triple-Reassortante des H3N2 und nicht mit einer Doppel-Reassortante erzielt wurde (siehe 5.4.1.2). Diese Beobachtung ist ein Hinweis dafür,

dass sich das homologe M-Gensegment bei Anzucht im embryonierten Hühnerei potenziell steigend auf die Antigenmenge auswirken kann, wobei jedoch im Falle des H3N2-Isolates die höchsten Ausbeuten mit den klassischen Doppel-Reassortanten im PR8-Hintergrund erzielt wurden. Bei der zuvor erwähnten publizierten Analyse der genetischen Zusammensetzung der in der Impfstoffproduktion eingesetzten Saatviren wurde bei keinem der untersuchten H1N1pdm09-Reassortanten das M-Gensegment des Impfstoffkandidaten detektiert [176]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten jedoch einen möglichen vorteilhaften Einfluss auf die erzielbare Antigenmenge durch das homologe M-Gensegment an, da bei der Anzucht im Hühnerei die mit Abstand höchsten erzielbaren absoluten HA-Antigengehalt im SRID-Assay im PR8-Hintergrund bei einer Triple- und nicht bei einer Doppel-Reassortante gemessen wurden (siehe 5.4.1.2).

Für das aviäre potenziell pandemische H9N2-Donorvirus zeigte sich, dass die Inkorporation des homologen M-Gensegmentes im FPVmut-Hintergrund eine eindeutige Steigerung der HA-Antigenmenge im Hühnerei bewirkte (siehe 5.4.1.2). Diese Triple-Reassortante erzielten ebenfalls bei der Virusvermehrung in MDCK-Zellen bis 24 Stunden nach Infektionsbeginn die höchsten HA-Titer (siehe 5.3.1). Hingegen bewirkte die Integration des M-Gensegmentes bei dem aviären H5N1-Isolat keine solche Steigerung der erzielbaren Antigenmenge gegenüber den Doppel-Reassortanten im FPVmut Hintergrund, da die erzeugbaren Antigenmengen bei den Triple-Reassortanten im Durchschnitt etwas niedriger ausfielen als bei den Doppel-Reassortanten. Auch wenn im Vergleich der mittleren Ausbeuten die klassischen Doppel-Reassortanten im FPVmut-Akzeptorstamm sich somit als geeigneter für eine höhere H5-Antigenausbeute herausstellten, so wurden trotzdem die mit Abstand höchsten individuellen Einzelwerte im SRID-Assay bei zwei Triple-Reassortanten nach Vermehrung im Hühnerei gemessen (siehe 5.4.1.2). Neben der Anzucht im Hühnerei konnten auch im Vero-Zellsystem eine signifikante Steigerung der H5-Antigenmenge mit beiden genetischen Konstellationen im FPVmut-Hintergrund gegenüber dem PR8-Akzeptor erzielt werden (siehe 5.4.1.4). In den Untersuchungen von Abt *et al.* erwiesen sich die H5-Reassortanten bei denen das M-Gensegment aus einem humanen H3N2-Isolat im PR8-Hintergrund integriert wurde als die am geeignetste genetische Konstellation für die Impfstoffproduktion. Die Saatviren profitierten ebenfalls von der Integration des homologen M-Gensegmentes gegenüber den klassischen Doppel-Reassortanten, nicht aber von dem Einbringen eines anderen aviären M-Gensegmentes [179]. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten H5-Isolates konnte keine Steigerung im PR8-Hintergrund durch Integration des zu den Oberflächenproteinen homologen M-Gensegments erreicht werden, da die HA-Ausbeute im Durchschnitt in den Triple-Reassortanten niedriger ausfiel als in den Doppel-Reassortanten. (siehe 5.4.1.2) wie

jedoch bereits beschrieben konnte eine deutliche Verbesserung in der Antigenausbeute durch die alternative Verwendung des aviären Hintergrundstammes FPVmut erreicht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass der Effekt der Integration des M-Gensegmentes in Impfstoffsaatviren nicht generalisiert werden kann. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass für jedes individuelle Virus eine isolatspezifische Analyse vorgenommen werden muss, inwieweit sich die Anwesenheit eines homologen M-Gens vorteilhaft auf die erzielbare HA-Antigenausbeute auswirkt. Dabei sind sowohl die spezifischen Donorviren als auch die zur Reassortierung eingesetzten Akzeptorstämme zu berücksichtigen, da bestimmte Eigenschaften des M-Gens nicht nur vom eigentlichen Genprodukt abhängig sind sondern auch Folge des viralen Gesamtkontext der internen Gene sein können [180]. Eine Möglichkeit für die frühzeitige Austestung und Identifizierung optimierter genetischer Konstellationen bietet sich in den interpandemischen Phasen im Zuge der prophylaktischen Erstellung von Virusbanken – zur Herstellung potenzieller Saatviren – mit neuen gegebenenfalls aviären Subtypen an. Wie sich anhand des H9N2-Isolates herausgestellt hat, kann sich je nach zirkulierendem Isolat das Bereitstellen des homologen M-Gensegmentes als eine wertvolle Alternative zur Erzeugung von Impfstoffsaatviren im Vergleich zu den klassischen Doppel-Reassortanten erweisen.

6.2 Interaktionen zwischen dem M1-Protein und den Oberflächenproteinen HA, NA und M2

Das M-Gensegment der Influenza-A-Viren kodiert für zwei unterschiedliche Polypeptide (M1, M2), wobei die Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen humanen und aviären Isolaten mit bis zu 5 % im M1-Protein geringer sind als die Variabilität im M2-Ionenkanalprotein, wo sie bis zu 20 % betragen können [178;181]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden 4-8 % Unterschiede in der M1-Sequenz und 7-20 % bei dem M2 ermittelt (siehe Tabelle 10). Beim Vergleich der beiden untersuchten Akzeptorstämme FPVmut und PR8 wurden für das M1-Protein 96 % Homologie und für das M2-Protein 86 % ermittelt.

Tabelle 10: Homologiegrad der M1- und M2-Proteine der verwendeten Influenzaisolate

Dargestellt ist die Sequenzähnlichkeit in Prozent zwischen den unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten M1- (oben) und M2-Proteinen (unten). Der Vergleich mit dem PR8-Akzeptorstamm ist blau und der mit dem FPVmut grün hinterlegt.

		Homologiegrad [%]						
		H1N1	H1N1/PR8	H3N2	H1N1pdm09	H5N1	H7N1/FPVmut	H9N2
M1-Proteinsequenz	H1N1	100	96	95	94	93	93	92
	H1N1/PR8		100	96	95	94	96	94
	H3N2			100	92	94	95	93
	H1N1pdm09				100	96	94	95
	H5N1					100	94	96
	H7N1/FPVmut						100	94
	H9N2							100
		Homologiegrad [%]						
		H1N1	H1N1/PR8	H3N2	H1N1pdm09	H5N1	H7N1/FPVmut	H9N2
M2-Proteinsequenz	H1N1	100	86	90	81	80	81	86
	H1N1/PR8		100	90	86	84	86	88
	H3N2			100	84	84	84	88
	H1N1pdm09				100	92	91	93
	H5N1					100	91	93
	H7N1/FPVmut						100	94
	H9N2							100

Das multifunktionale M1-Protein agiert, wie im Kapitel 6.1.2 beschrieben, als Vermittler zwischen den RNPs und den Oberflächenproteinen sowie zusätzlich über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Lipidmembran [10]. Die M1-Proteine sind folglich maßgeblich an der Entstehung der Virusmorphologie mitbeteiligt und können hierüber auch beeinflussen, ob die Viruspartikel eher eine sphärische oder filamentöse Form besitzen [154;182]. Anhand der durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen (siehe 5.5) konnte jedoch gezeigt werden, dass durch den Austausch der M-Gensegmente oder des Hintergrundstammes keine Veränderung der Partikelform bei den generierten rekombinanten Viren aufgetreten ist und alle einen überwiegend sphärischen Charakter aufweisen.

Neben den Einflüssen auf die Virionenform spielt die Interaktion zwischen dem M1- und den HA-, NA- sowie den M2-Proteinen eine Rolle für die Virusfreisetzung [183]. Sowohl das HA als auch die NA sind an der Rekrutierung und Bindung des M1-Proteins an der Lipidmembran beteiligt, welches auch ohne die Mitwirkung anderer viraler Proteine direkt an diese beiden Oberflächenproteine binden kann [184-186]. Somit ist die Wechselwirkung zwischen diesen viralen Komponenten ein wichtiger Faktor für die Viruspartikelbildung.

Bestimmte Aminosäuren des M1-Proteins wie beispielsweise Valin an Position 115 und Threonin an Position 137 sind typisch für aviäre Isolate. Diese Signaturen befinden sich neben dem H1N1-Isolat der Spanischen Grippe aus dem Jahr 1918 auch in den in dieser

Arbeit verwendeten H5N1-, H9N2- und H1N1pdm09-Isolaten sowie dem FPVmut. Humane Viren kennzeichnen sich hingegen durch Isoleucin an Position 115 und Alanin an Position 137, wie es für die beiden hier verwendeten saisonalen H1N1- und H3N2-Vakzinestämme und den PR8-Akzeptorstamm der Fall ist. Bis jetzt konnte diesen beiden Aminosäuren noch keine bekannte Funktion zugeordnet werden [178]. Solche wirtsspezifischen Signaturen könnten aber eine Erklärung darstellen, warum es in bestimmten Fällen nutzbringend sein kann – gerade bei Donorviren mit aviären Ursprung – das homologe M-Gensegment mit in die Saatvirus-Reassortanten zu integrieren. Die Aufschlüsselung an spezifischen Interaktionen beteiligter Aminosäuren des M1-Proteins mit den Oberflächenproteinen und daraus resultierender Effekte bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

Für das HA-Protein wurde publiziert, dass sowohl der cytoplasmatische Abschnitt, der die letzten zehn C-terminalen Aminosäuren umfasst, als auch die Transmembrandomäne Einfluss auf die Membranassoziation des M1-Proteins nehmen [185;187]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Isolaten ist Sequenz des cytoplasmatischen Bereiches bei dem H1N1-, dem H1N1pdm09- sowie dem H5N1-Isolat identisch und unterscheidet sich in drei bzw. fünf Austausch vom H9N2 bzw. vom H3N2 (siehe Abbildung 6-1 A). In Tabelle 11 sind die Sequenzähnlichkeiten innerhalb der HA-Proteine aufgeführt sowie zusätzlich separat der Homologiegrad des Bereiches der in die Interaktion mit dem M1-Protein involvierten Transmembrandomäne inklusive des cytoplasmatischen Abschnittes. Im FPVmut Hintergrund konnten die mittels des SRID-Assays ermittelten Antigenmengen durch die Integration des homologen M-Gensegmentes besonders bei dem H9N2-Donorvirus aber auch bei dem H1N1pdm09-Isolat gesteigert werden. Hierbei handelt es sich auch um die beiden Viren, bei denen der in die Wechselwirkungen mit dem M1-Protein involvierte Bereich mit 29 % die geringste Homologie mit dem des FPVmut aufweist und sich daher eventuell besonders in diesen beiden Fällen das Einbringen des homologen M-Gensegmentes positiv ausgewirkt hat durch eine möglicherweise optimierten genetischen Kompatibilität zwischen dem M1- und dem HA-Protein.

A**HA-Proteine**

	Transmembrandomäne	cytoplasmatischer Abschnitt
	185 200	
H1 (N1)	QILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCS	NGSLQCRICI
H3 (N2)	DWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQ	KGNIRCNICI
H1 (N1) pdm09	QILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCS	NGSLQCRICI
H5 (N1)	QILSIYSTVASSIALAIMVAGLSLWMCS	NGSLQCRICI
H9 (N2)	KILTIYSTVASSLVIAMGFAAFLFWAMS	NGSCRCNICI
PR8	QILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCS	NGSLQCRICI
FPVmut	DVILWFSFGASCFLLLAIAMGLVFICVK	NGNMRCTICI

B**NA-Proteine**

	cytoplasmatischer Abschnitt	Transmembrandomäne
	1 7 20	
(H1) N1	MNPNQK	IITIGSISIAIGIISLILQIGNIISIWAS
(H3) N2	MNPNQK	IITIGSVSLTISTICFFMQIAILITTVTL
(H1) N1pdm09	MNPNQK	IITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWIS
(H5) N1	MNPNQK	IITIGSICMVTGIVSLMLQIGNMISIWVS
(H9) N2	MNPNQK	IIAIGSVSLTIAIICFLMQIAILTTMTL
PR8	MNPNQK	IITIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWIS
FPVmut	MNPNQK	IITIGSICMGIGIISLILQIGNIISMWVS

C**M2-Proteine**

	cytoplasmatischer Abschnitt
	44 60 80
H1N1	DRLEFSKSIYRIFKHGLKGGPSTEGVPE SMREEYREEQQNAVDADDGHFVSIELE
H3N2	DRLEFFKCVYRLEFKHGLKRGPSLEGVPE SMREEYRKEQQNAVDADDGHFVSIELE
H1N1pdm09	DRLEFFKCIYRRFKYGLKRGPSLEGVPE SMREEYQEQQSAVDVDDGHFVNIELE
H5N1	DRLEFFKCIYRRLKYGLKRGPATAGVPE SMREEYRQEQQSAVDVDDGHFVNIELE
H9N2	DRLEFFKCIYRRFKYGLKRGPSLEGVPE SMREEYRQEQQSAVDVDDGHFVNIELE
PR8	DRLEFFKCIYRRFKYGLKGGPSTEGVPE SMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE
FPVmut	NRLFFKCIYRRLKYGLKRGPSLEGVPE SMREEYRQEQQSAVDVDDGHFVNIELE

Abbildung 6-1 Sequenz der transmembranen und cytoplasmatischen Abschnitte der HA-, NA- und M2-Proteine der verwendeten Influenzaisolate

Dargestellt sind die transmembranen und cytoplasmatischen Abschnitte, wobei die roten Aminosäurereste in allen Isolaten konserviert sind. (A) HA-Proteine, wobei die H3-Nummerierung verwendet wurde und sich die HA-Spaltstelle zwischen Aminosäure -1 und +1 befindet. In Anlehnung an [188] (B) NA-Proteine und (C) M2-Proteine

Bei dem NA-Protein handelt es sich um ein Transmembranprotein des Typs II, bei dem der aminoterminal Teil intrazellulär liegt [4] und der aus sechs Aminosäuren bestehende cytoplasmatische Bereich zwischen den Viren hochkonserviert ist [189]. Der Homologiegrad der NA-Proteine sowie des Bereiches der Transmembrandomäne inklusive des cytoplasmatischen Abschnittes ist in Tabelle 11 aufgeführt. Die Sequenzunterschiede in dem Bereich der Transmembrandomäne im Vergleich zu beiden Akzeptorstämmen sind am größten bei dem H3N2- und dem H9N2-Isolat. Anhand des einfachen Vergleiches der Sequenzen und der damit beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten können jedoch keine Aussagen bezüglich der Ausprägung genetischer Inkompatibilitäten gezogen werden. In weiteren Untersuchungen müssen experimentell die Aminosäuren identifiziert werden, die aufgrund einer möglichen Interaktion zwischen den Oberflächenproteinen und dem M1-Protein dazu beitragen höhere Antigenausbeuten in Folge der optimierten Kompatibilität zu erhalten.

Tabelle 11: Homologiegrad der HA- und NA-Proteine der verwendeten Influenzaisolate

Dargestellt ist die Sequenzähnlichkeit in Prozent zwischen den unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten HA- (oben) und NA-Proteinen (unten). Die Angaben vor dem Schrägstrich beziehen sich auf das gesamte Protein, die dahinter auf den transmembranen zuzüglich des cytoplasmatischen Abschnittes. Der Vergleich mit dem PR8-Akzeptorstamm ist blau und der mit dem FPVmut grün hinterlegt.

		Homologiegrad [%]						
		gesamtes Protein / cytoplasmatischer Abschnitt + Transmembrandomäne						
		H1N1	H1N1/PR8	H3N2	H1N1pdm09	H5N1	H7N1/FPVmut	H9N2
HA-Proteinsequenz	H1N1	100	87 / 100	40 / 32	80 / 97	62 / 74	40 / 32	52 / 60
	H1N1/PR8		100	39 / 32	83 / 97	64 / 74	41 / 32	52 / 60
	H3N2			100	40 / 32	39 / 29	46 / 50	37 / 32
	H1N1pdm09				100	63 / 74	41 / 29	50 / 60
	H5N1					100	42 / 32	50 / 58
	H7N1/FPVmut						100	40 / 29
	H9N2							100
		Homologiegrad [%]						
		gesamtes Protein / cytoplasmatischer Abschnitt + Transmembrandomäne						
		H1N1	H1N1/PR8	H3N2	H1N1pdm09	H5N1	H7N1/FPVmut	H9N2
NA-Proteinsequenz	H1N1	100	86 / 83	42 / 51	81 / 77	80 / 77	82 / 86	41 / 48
	H1N1/PR8		100	40 / 48	80 / 80	82 / 80	86 / 83	41 / 43
	H3N2			100	42 / 51	41 / 43	42 / 48	83 / 83
	H1N1pdm09				100	84 / 74	84 / 80	42 / 46
	H5N1					100	90 / 83	42 / 40
	H7N1/FPVmut						100	43 / 46
	H9N2							100

Neben den antigenen Oberflächenproteinen HA und NA interagiert das M1-Protein auch mit dem cytoplasmatischen Abschnitt des Ionenkanalproteins M2. Wie die Abbildung 6-1 C zeigt ist der überwiegende Teil des cytoplasmatischen Bereiches des M2 zwischen den verwendeten Isolaten konserviert und die Viren sind in diesem Bereich zu 78-98 % identisch.

Bis jetzt konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden, welche der Aminosäuren des M2-Proteins für diese Wechselwirkungen verantwortlich sind, da sich in der Literatur hierzu bezüglich divergente Aussagen finden. Es wurde beschrieben, dass für die Interaktion zwischen den beiden M-Proteinen die Aminosäuren 71-76 des M2-Proteins eine entscheidende Rolle spielen, insbesondere die ersten drei [50], wobei diese Sequenz zwischen allen in dieser Arbeit verwendeten Isolaten konserviert ist. Hiervon abweichend wurden die Aminosäuren 45-69 des M2-Proteins als verantwortlich für die M1-Bindung identifiziert, Aminosäure 70-77 als notwendig für eine effiziente Virusbildung und die Aminosäuren 82-89 in Abhängigkeit des verwendeten Isolates als wichtig für die Entstehung infektiöser Viruspartikel [190]. Wie der in Abbildung 6-1 C aufgeführte Sequenzvergleich zeigt, treten bei den verwendeten Isolaten Unterschiede bei den Aminosäuren im Bereich der Position 45-69 auf. Bei dem H9N2-Isolat konnte der stärkste Vorteil für die Antigenproduktion bei der Integration des homologen M-Gensegmentes im FPVmut-Hintergrund beobachtet werden. Die Sequenzen unterscheiden sich in diesem Bereich lediglich in der Aminosäure an Position 55, bei der in dem H9N2-Isolat ein Phenylalanin (F) und bei dem FPVmut ein Leucin (L) vorhanden ist.

Bei der Verwendung des homologen M-Gensegmentes im Falle des H9N2-Isolates wurde der größte positive Einfluss auf die produzierbare HA-Antigenmenge beobachtet. Die Identität des transmembranen Abschnittes und des cytoplasmatischen Bereiches der HA-Sequenz des in dieser Arbeit verwendeten H9N2-Isolates und des FPVmut liegt mit 29 % deutlich niedriger als die 60 % Ähnlichkeit zum PR8-Isolat. Möglicherweise wirkten sich deswegen besonders in diesem Fall die Verfügbarkeit des homologen M-Gensegmentes und die damit einhergehende deutlich gesteigerte Kompatibilität zwischen dem HA und dem M1 positiv aus. Welche Aminosäure exakt eine Rolle für eine optimierte Kompatibilität zwischen dem M1-Protein und den Oberflächenproteinen HA, NA und M2 spielt muss in weiteren Studien aufgeklärt werden.

Die Integration des homologen M-Gensegmentes in die Impfstoffsaatviren wirkt sich in dem Moment positiv auf die Antigenausbeute aus, in dem der Einfluss der optimierten genetischen Kompatibilität über den Effekt des mit einer guten Virusausschüttung assoziierten M-Gensegmentes des PR8-Isolates triumphiert. Welcher Vorteil ausschlaggebend ist muss für jedes Isolat jedoch individuelle experimentell ermittelt werden.

6.3 Replikationseigenschaften der generierten Reassortanten im Zellkultur-System

Bei der Vermehrung von Influenzaviren in Zellkultur ist die höchste Ausbeute an Viruspartikel bei solchen Isolaten zu erwarten, die sich durch einen schnellen Infektionsbeginn verbunden mit einer spät induzierten Apoptose der Zellen auszeichnen [191;192]. Wie gezeigt wurde, setzt bei allen mit dem FPVmut gebildeten Reassortanten eine produktive MDCK-Zellinfektion zeitlich früher als bei den PR8-Reassortanten ein (siehe 5.3.1). Zusätzlich konnte für die H5-Reassortanten ein signifikanter Vorteil bei Verwendung des FPVmut-Hintergrundstammes im Vergleich zum PR8-Akzeptor in den Vero-Zellen beobachtet werden (siehe 5.4.1.4). Folglich bringt das FPVmut im Vergleich zum PR8 die genetische Voraussetzung für eine schnelle Infektionsinduktion mit. Hierbei können Faktoren wie eine möglicherweise schnellere Aufnahme der Viren in die Zelle, ein schnellerer Transport der RNPs in den Zellkern, die Aktivität der viralen Polymerasen und eine verbesserte Freisetzung der neugebildeten Viren eine Rolle spielen. Insbesondere für die PB1-Polymerase wurde beschrieben, dass sie Einfluss auf die Virusausbeute nehmen kann. Durch die parallele Mutation von fünf Aminosäuren der PB1-Polymerase des PR8 konnte eine Steigerung der Virusreplikation sowohl im Hühnerei als auch in Zellkultur mit höheren viralen Proteinmengen bei den früheren Infektionszeitpunkten induziert werden. Hierbei handelt es sich um die Aminosäureaustausche G180E, S216G, S361R, Q621R und N654S [193]. Die Sequenz der PB1 des FPVmut besitzt an Position 180 die Aminosäure Glutaminsäure (E) und an Position 654 die Aminosäure Serin (S), was einen möglichen Erklärungsansatz für den früheren Infektionsbeginn bieten könnte. Zusätzlich wurde beschrieben, dass sich FPV-Reassortanten mit der PB1- oder der PB2-Polymerase aus einem niedrigpathogenen aviären Isolat anstelle jener des PR8-Isolates durch eine deutlich schneller nachweisbare Replikation auszeichneten [169]. Somit ist das in den FPVmut-Reassortanten beobachtete Phänomen des schnelleren Virusnachweises nach der Infektion von MDCK-Zellen (siehe 5.3.1) möglicherweise auf die höhere Aktivität der Polymerasegene zurückzuführen.

Bei den mit den aviären Donorisolaten erzeugten Viren wurde anhand der mit dem Plaque-Assay generierten Daten weitergehend beobachtet, dass auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Infektion bei einigen FPVmut-Reassortanten höher als bei ihren entsprechenden PR8-Reassortanten im MDCK-Zellsystem war (siehe 5.3.2). Dieses könnte ein Indiz für eine in den FPVmut-Reassortanten früher induzierte Apoptose sein, da bei dieser Nachweismethode die bereits zerstörten Zellbereiche sichtbar gemacht werden.

Die mikroskopischen Beobachtungen während des zeitlichen Verlaufes einer Zellinfektion (Daten nicht gezeigt) ergaben, dass in den mit den FPVmut-Reassortanten infizierten Zellen in aller Regel zu früheren Zeitpunkten ein cytopathischer Effekt feststellbar war und die Zellen insgesamt früher als die entsprechenden PR8-Reassortanten vollständig lysiert waren. Die insgesamt schneller Zellzerstörung könnte eine mögliche Ursache dafür sein, weshalb die FPVmut-Reassortanten zwar einen Replikationsvorteil zu den frühen Infektionszeitpunkten aufweisen, die PR8-Reassortanten zu späteren Zeitpunkten höhere Titer erzielen (siehe 5.3.1), da die pro Zelle maximale Anzahl an produzierbaren Viruspartikeln bei den PR8-Viren höher ausfallen könnte. Das experimentelle Herausögern der Apoptose durch den Einsatz von Apoptose-Inhibitoren könnte daher eine Möglichkeit darstellen um die Antigenausbeute bei FPVmut-Reassortanten, die als Saatviren eingesetzt werden sollen, zu steigern und bedarf zur Aufklärung weiterer diesbezüglicher Untersuchungen.

6.4 Saisonale und pandemische Impfstoffe

Der HA-Antigengehalt ist derzeit der einzige normierte Zielwert für den im Impfstoff enthaltenden Wirkstoff, der im Rahmen der Chargenfreigabe über die Messung im SRID-Assay überprüft wird. Bei dieser Methode kann nur der in das Gel eindiffundierte Antigenanteil gemessen und damit quantifiziert werden. Das Problem hierbei ist, dass nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, dass möglicherweise größere Aggregate in den gestanzten Löchern verbleiben und dadurch nicht bei der Messung des Gehaltes berücksichtigt werden, wodurch mehr als die geforderte Antigenmenge in einer Impfdosis enthalten sein könnte. Dem in den Impfstoffen enthaltenem Gesamtgehalt des zweiten viralen Oberflächenantigens der NA wird hingegen eher wenig Bedeutung zu geschrieben, da der pro Impfdosis enthaltende NA-Zielgehalt weder festgelegt ist noch die vorhandene NA-Menge während der Produktion oder im Rahmen der Chargentestung quantifiziert wird. Auch erfolgt keine individuelle Bewertung der durch die Impfung gegen die NA induzierten Immunreaktion obwohl bekannt ist, dass die Ausbildung NA-spezifischer Antikörper dazu beiträgt die Ausbreitung der Viren im Wirt zu verhindern und in Folge der Reduktion der Viruslast einen milderen Krankheitsverlauf zu bewirken [2;63;91-93]. Somit sollte den durch die Impfung induzierten NA-spezifischen Antikörpern eine wichtigere Rolle beigemessen werden, als dies momentan der Fall ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Verwendung der unterschiedlichen Akzeptorstämme einen Einfluss auf den NA-Gehalt der Saatviren nimmt. Da jeweils rekombinante Viren miteinander verglichen wurden, die das gleiche NA-Gen trugen, konnte der NA-Gehalt indirekt über die messbare NA-Aktivität

nachgewiesen werden. Es wurden hierbei jedoch keine entscheidenden Unterschiede zwischen den beiden Hintergrundstämmen beobachtet (siehe 5.4.2).

Alle unterschiedlichen saisonalen Impfstoffe werden im Rahmen der jährlichen Anpassung an die neuen zirkulierenden Stämme ausschließlich anhand der mit ihnen induzierbaren hämagglutinationshemmenden Antikörper (HI-Titers) miteinander verglichen. Hierbei werden keine weiteren induzierten Immunreaktionen berücksichtigt wie die NA-spezifischen Antikörper oder jene, die möglicherweise gegen die internen Proteine wie das NP oder das M1 gerichtet sind. Mittels der Ermittlung des HI-Titers kann somit nur eine – durch die Impfung induzierte – spezifische Teilreaktion des Immunsystems bewertet werden. Bei den pandemischen Impfstoffen oder neuen Impfstoffentwicklungen für die saisonale Impfung werden ergänzend zu den HI-Titern auch virusneutralisierende Titer (VN-Titer) erhoben, bei denen alle zur Verhinderung einer Zellinfektion beitragenden Antikörper gemessen werden. Für den HI-Titer wird zurzeit ein Titer von 1/40 mit einer protektive Schutzwirkung korreliert [98], wohingegen kein Grenzwert für den VN-Titer festgesetzt ist. Daher bietet derzeit der HI-Titer die einzige Möglichkeit zur standardisierten Bewertung der Immunreaktion auf die Impfung anhand der serologischen Daten [194]. Die Eliminierung der Viren aus dem Organismus erfolgt durch cytotoxische T-Zellen, welche bestimmte T-Zellepitope hauptsächlich aus dem NP- aber auch den M-, NS- und den Polymerase-Proteinen erkennen und die gleichzeitig für die Induktion eines kreuzreaktiven Schutzes auch vor heterologen Influenzaviren verantwortlich sind [4;194;195]. Prinzipiell kann die Bereitstellung weiterer Gensegmente des zirkulierenden Isolates, wie beispielsweise dem M-Gensegment für die Erkennung und Bekämpfung der Viren durch das zelluläre Immunsystem eine wichtige Rolle spielen.

Die jährlich wiederkehrende, saisonale Impfung ist eine Auffrischimpfung (*Booster-Impfung*), bei der eine einmalige Gabe an Impfantigen ausreichend ist, um die Anpassung des Immunsystems an die neuen Driftvarianten zu gewährleisten und einen bestehenden Grundimmunität aufgrund vorheriger Impfungen oder natürlicher Infektionen zu reaktivieren. Im Hinblick auf die bestehende Influenzaimpfempfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) für alle Personen über 60 Jahre [87;88] ist für eine erfolgreiche Immunisierung dieser Zielgruppe die sogenannte Immunoseneszenz zu beachten. Es handelt sich hierbei um den Effekt des mit zunehmendem Alter schwächer werdenden Immunsystems. Damit verbunden ist eine mit zunehmendem Alter rückläufige Immunantwort nach einer Influenzaimpfung. Entsprechend wurde bei den über 65-Jährigen beobachtet, dass zur Erreichung hoher HI-Titer höhere Impfantigenmengen eingesetzt werden müssen [63;196],

woraufhin im Jahr 2010 in den Vereinigten Staaten von Amerika die erste altersspezifische Impfstoffformulierung mit jeweils 60 µg HA pro Impfvirusstamm anstelle der normalerweise eingesetzten 15 µg zugelassen wurde [197]. Es ist vorhersehbar, dass in Zukunft altersspezifische Impfstoffkonzepte eine zunehmende Rolle einnehmen werden, woraus klar ersichtlich wird, wie wichtig die Erforschung von Wegen zur Steigerung der Antigenausbeuten nicht nur für pandemische Szenarien ist.

Im Gegensatz zu einer saisonalen Epidemie handelt es sich bei dem Erreger einer Pandemie um ein neuartiges Influenzavirus häufig mit aviären Ursprung, das auf eine weitestgehend immunologisch naive Bevölkerung trifft. Die pandemische Impfung ist daher im Vergleich zu der saisonalen Impfung als Grundimmunisierung anzusehen, bei der zum Aufbau der Schutzwirkung in einer naiven Bevölkerung ein aus zwei Teildosen bestehendes Immunisierungsschema (*Prime*- und *Booster*-Impfung) notwendig sein kann. Bei der Entwicklung von pandemischen Impfstoffen wird derzeit der Fokus auf die aviären Subtypen H5, H7 und H9 gelegt [63]. Gerade im Hinblick auf die aktuelle Lage in China, wo zurzeit ein neues aviäres H7N9-Virus vermehrt zu humanen Infektionen führt, zeigt sich die dringende Notwendigkeit der Entwicklung geeigneter pandemischer Impfstoffe. Seit dem erstmaligen serologischen Nachweis einer humanen H7N9-Infektion Ende März bis zum 12. April 2013 wurden bereits 43 Fälle inklusive 11 letal verlaufenden Infektionen gemeldet [198;199]. Bei diesem Virus handelt es sich um eine Triple-Reassortante aus drei unterschiedlichen aviären Isolaten, bei der die internen Gensegmente aus einem H9N2-Virus stammen [200]. Die in China – einer häufigen Quelle neuer pandemischer Viren – nachgewiesenen humanen H7N9-Infektionen sind in dieser Kombination völlig neu, da zuvor nur von Übertragungen des H7 auf den Menschen in Kombination mit der Neuraminidase der Subtypen 2, 3 und 7 berichtet wurde [201]. Bei dem FPVmut handelt es sich ebenfalls um ein H7-Virus, das bereits erfolgreich für die Immunisierung im aviären Wirt eingesetzt wurde und nachweislich auch vor der Infektion mit einem heterologen, hochpathogenen H7N7-Virus schützt [83]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass es sich gerade bei aviären Viren wie dem H5N1 lohnt um hohe Antigenausbeuten zu erhalten für die Reassortierung einen aviären Akzeptorstamm wie das FPVmut anstelle des PR8-Isolates zu verwenden. Zur Erzielung bestmöglicher Impfstoffausbeuten ist es daher zunehmend wichtig gerade in Hinblick für die Reassortierung neuer Viren verschiedene genetische Konstellationen auszutesten.

Es konnte anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten gezeigt werden, dass sich die Nutzung eines aviären Hintergrundstammes steigernd auf die Antigenausbeute

auswirken kann. Auch kann sich im Einzelfall die Integration weiterer interner Gene des zirkulierenden Impfvirus in die Saatviren positiv auf die produzierbare Antigenmenge auswirken. Es lässt sich jedoch nicht vorab anhand des Ursprunges des Isolates oder des Subtypen festlegen, welche Konstellationen den größten Effekt ausüben. Sofern noch keine bestimmten Aminosäurensignaturen identifiziert sind, die mit einer vorteilhaften Interaktion zwischen den internen Genen und den Oberflächenproteinen und einer damit einhergehenden Replikationssteigerung assoziiert sind, muss von Isolat zu Isolat experimentell überprüft werden, ob sich die hier vorgestellten Varianten des aviären Hintergrundstammes oder der Triple-Reassortanten eignen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Tellier R. Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg Infect Dis* 2006 Nov;12(11):1657-62.
- [2] Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999 Oct 9;354(9186):1277-82.
- [3] Pringle CR. Virus taxonomy 1. *Arch Virol* 1996;141(11):2251-6.
- [4] Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Orthomyxoviren. *Molekulare Virologie*. 3th ed. 2010: p. 355-84.
- [5] Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2007: p. 1647-89.
- [6] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005 Mar;79(5):2814-22.
- [7] Tong S, Li Y, Rivallier P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Mar 13;109(11):4269-74.
- [8] A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* 1980;58(4):585-91.
- [9] Lamb RA, Choppin PW. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 1983;52:467-506.
- [10] Ruigrok RW, Barge A, Durrer P, Brunner J, Ma K, Whittaker GR. Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* 2000 Feb 15;267(2):289-98.
- [11] Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* 2009 Aug;143(2):147-61.
- [12] Schmitt AP, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Adv Virus Res* 2005;64:383-416.
- [13] Nayak DP, Hui EK, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 2004 Dec;106(2):147-65.
- [14] Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 2008 Feb;6(2):143-55.
- [15] Garcia-Sastre A, Egorov A, Matasov D, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 1998 Dec 20;252(2):324-30.
- [16] Jagger BW, Wise HM, Kash JC, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 2012 Jul 13;337(6091):199-204.
- [17] Shi M, Jagger BW, Wise HM, Digard P, Holmes EC, Taubenberger JK. Evolutionary Conservation of the PA-X Open Reading Frame in Segment 3 of Influenza A Virus. *J Virol* 2012 Nov;86(22):12411-3.
- [18] Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* 2000 Dec 15;19(24):6751-8.
- [19] Paterson D, Fodor E. Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLoS Pathog* 2012 Dec;8(12):e1003019.
- [20] Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 2001 Dec;7(12):1306-12.
- [21] Wise HM, Foeglein A, Sun J, et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* 2009 Aug;83(16):8021-31.

-
- [22] Wise HM, Barbezange C, Jagger BW, et al. Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Res* 2011 Sep 1;39(17):7775-90.
- [23] Selman M, Dankar SK, Forbes NE, Jia JJ, Brown EG. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg Microbes Infect* 2012 Nov 21;1:e42.
- [24] Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog* 2012 Nov;8(11):e1002998.
- [25] Mubareka S, Palese P. Influenza virus: The Biology of a changing virus. In: Rappuoli R, Del Giudice G, editors. *Influenza vaccines for the future*. 2nd ed. Basel, Springer, 2011: p. 3-26.
- [26] Yewdell JW, Ince WL. Virology. Frameshifting to PA-X influenza. *Science* 2012 Jul 13;337(6091):164-5.
- [27] Desselberger U, Racaniello VR, Zazra JJ, Palese P. The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 1980 Feb;8(3):315-28.
- [28] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 2001 Dec;146(12):2275-89.
- [29] Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Peter M, Griffin DE, editors. *Fields Virology*. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007: p. 1692-740.
- [30] Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Jul;78(7):4170-4.
- [31] Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994 Nov 15;205(1):17-23.
- [32] Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 1983 Jun;127(2):361-73.
- [33] Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 1987;56:365-94.
- [34] Garten W, Klenk H-D. Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. In: Klenk HD, Matrosovich M.N., Stech J, editors. *Avian Influenza*. Vol 27 ed. Basel, Karger, 2008: p. 156-67.
- [35] Bui M, Whittaker G, Helenius A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* 1996 Dec;70(12):8391-401.
- [36] Zhirnov OP. Solubilization of matrix protein M1/M from virions occurs at different pH for orthomyxo- and paramyxoviruses. *Virology* 1990 May;176(1):274-9.
- [37] Zhirnov OP, Grigoriev VB. Disassembly of influenza C viruses, distinct from that of influenza A and B viruses requires neutral-alkaline pH. *Virology* 1994 Apr;200(1):284-91.
- [38] Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 1992 May 1;69(3):517-28.
- [39] Huang RT, Rott R, Klenk HD. Influenza viruses cause hemolysis and fusion of cells. *Virology* 1981 Apr 15;110(1):243-7.
- [40] Maeda T, Ohnishi S. Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes. *FEBS Lett* 1980 Dec 29;122(2):283-7.
- [41] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 2000;69:531-69.

-
- [42] Godley L, Pfeifer J, Steinhauer D, et al. Introduction of intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza hemagglutinin abolishes membrane fusion activity. *Cell* 1992 Feb 21;68(4):635-45.
 - [43] Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 1994 Sep 1;371(6492):37-43.
 - [44] Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 1999 May 25;258(1):1-20.
 - [45] Horimoto T, Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* 1994 May;68(5):3120-8.
 - [46] Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 1975 Dec;68(2):426-39.
 - [47] Lazarowitz SG, Choppin PW. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 1975 Dec;68(2):440-54.
 - [48] Bosch FX, Garten W, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology* 1981 Sep;113(2):725-35.
 - [49] Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 1994 Feb;2(2):39-43.
 - [50] Chen BJ, Leser GP, Jackson D, Lamb RA. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol* 2008 Oct;82(20):10059-70.
 - [51] Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* 2000 Dec;74(24):11538-47.
 - [52] Latham T, Galarza JM. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol* 2001 Jul;75(13):6154-65.
 - [53] Palese P, Compans RW. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* 1976 Oct;33(1):159-63.
 - [54] Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 1974 Oct;61(2):397-410.
 - [55] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992 Mar;56(1):152-79.
 - [56] Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006 Mar 23;440(7083):435-6.
 - [57] Claas EC, de Jong JC, van BR, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* 1998 May;16(9-10):977-8.
 - [58] Claas EC, Osterhaus AD, van BR, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998 Feb 14;351(9101):472-7.
 - [59] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Feb 3;101(5):1356-61.
 - [60] Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet* 2003 Nov 22;362(9397):1733-45.
 - [61] Knobler SL, Mack A, Mahmoud A, Lemon SM. Summary and Assessment. In: Institute of medicine of the national academies, editor. *The threat of pandemic influenza - are we ready?* Washington DC, The national academies press, 2005.
 - [62] Stevens J, Blixt O, Paulson JC, Wilson IA. Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nat Rev Microbiol* 2006 Nov;4(11):857-64.

-
- [63] Fiore AE, Bridges CB, Katz JM, Cox NJ. Inactivated influenza vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 6th ed. Elsevier Saunders, 2013: p. 257-93.
- [64] Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 1998 Sep;72(9):7367-73.
- [65] Belshe RB. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005 Nov 24;353(21):2209-11.
- [66] Scholtissek C. Pigs as Mixing Vessels for the Creation of New Pandemic Influenza A Viruses. *Medical Principles and Practice* 1990 Jan;2(2):65-71.
- [67] Shortridge KF, Stuart-Harris CH. An influenza epicentre? *Lancet* 1982 Oct 9;2(8302):812-3.
- [68] Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science* 2006 Apr 21;312(5772):384-8.
- [69] Khan K, Arino J, Hu W, et al. Spread of a novel influenza A (H1N1) virus via global airline transportation. *N Engl J Med* 2009 Jul 9;361(2):212-4.
- [70] Musher DM. How contagious are common respiratory tract infections? *N Engl J Med* 2003 Mar 27;348(13):1256-66.
- [71] Cate TR. Clinical manifestations and consequences of influenza. *Am J Med* 1987 Jun 19;82(6A):15-9.
- [72] Nugent KM, Pesanti EL. Tracheal function during influenza infections. *Infect Immun* 1983 Dec;42(3):1102-8.
- [73] Tashiro M, Ciborowski P, Klenk HD, Pulverer G, Rott R. Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia. *Nature* 1987 Feb 5;325(6104):536-7.
- [74] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;283:43-60.
- [75] World Health Organisation. WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics; URL:http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_CSR_GIP_2005.6.pdf [Zugriff 24.07.2012]. 2012. 24-7-2012.
- [76] Dormitzer PR. Cell culture-derived Influenza vaccines. In: Rappuoli R, Del Giudice G, editors. *Influenza vaccines for the future*. 2nd ed. Basel, Springer, 2011: p. 293-312.
- [77] Neumann G, Watanabe T, Ito H, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Aug 3;96(16):9345-50.
- [78] Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* 1999 Nov;73(11):9679-82.
- [79] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 23;97(11):6108-13.
- [80] Feldmann A, Schafer MK, Garten W, Klenk HD. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. *J Virol* 2000 Sep;74(17):8018-27.
- [81] OIE. On avian influenza: Manual of Diagnostic tests and vaccines; URL:http://web.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf [Zugriff 17.01.2013]. 2009. 17-1-2013.
- [82] Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 2006 Jun;12(6):881-6.
- [83] Wagner R, Gabriel G, Schlesner M, et al. Protease activation mutants elicit protective immunity against highly pathogenic avian influenza viruses of subtype H7 in chickens and mice. *Emerg Microbes Infect* 2013 Feb 27;2:e7.

- [84] WHO. Seasonal Influenza;
URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>
[Zugriff 17.07.2012]. Factsheet Nr. 211[April 2009]. 2012. 17-7-2012.
- [85] Simonsen L, Taylor RJ, Viboud C, Miller MA, Jackson LA. Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: an ongoing controversy. *Lancet Infect Dis* 2007 Oct;7(10):658-66.
- [86] Arbeitsgemeinschaft Influenza. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2011/12; URL:<http://influenza.rki.de/Saisonberichte/2011.pdf>
[Zugriff 05.02.2013]. Berlin; 2012.
- [87] Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Epidemiologisches Bulletin 2012 Jul 30;30:283-310.
- [88] Robert Koch-Institut. Antworten des RKI auf häufig gestellte Fragen zur saisonalen Influenzaimpfung Für wen wird die Impfung gegen die saisonale Influenza empfohlen?;
URL:http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/FAQ/Influenza/faq_ges.html?nn=2375548 [Zugriff 04.02.2013]. 7-9-2012. 4-2-2013.
- [89] Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Epidemiologisches Bulletin 2010 Aug 9;31:299-314.
- [90] Robert Koch-Institut. Antworten des RKI auf häufig gestellte Fragen zur saisonalen Influenzaimpfung Warum wird die Influenzaimpfung auch für Schwangere empfohlen?;
URL:<http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Influenza/FAQ03.html?nn=2370434>
[Zugriff 04.02.2013]. 7-9-2012. 4-2-2013.
- [91] Kilbourne ED, Laver WG, Schulman JL, Webster RG. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. *J Virol* 1968 Apr;2(4):281-8.
- [92] Murphy BR, Kasel JA, Chanock RM. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N Engl J Med* 1972 Jun 22;286(25):1329-32.
- [93] Schulman JL, Khakpour M, Kilbourne ED. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. *J Virol* 1968 Aug;2(8):778-86.
- [94] Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P, Wilson IA. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 2004 Mar 19;303(5665):1866-70.
- [95] Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE, Jr., Wilson IA. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* 2010 Apr 16;328(5976):357-60.
- [96] Corti D, Suguitan AL, Jr., Pinna D, et al. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J Clin Invest* 2010 May;120(5):1663-73.
- [97] Sui J, Hwang WC, Perez S, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol* 2009 Mar;16(3):265-73.
- [98] Committee for Proprietary medicinal products. Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines CHMP/BWP/214/96. 1997 Mar 12.
- [99] Salk JE, Pearson HE, . Immunization against influenza with observations during an epidemic of influenza A one year after vaccination. *Am J Hyg* 1945 Nov;42:307-22.
- [100] Collin N, de R, X. Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine* 2009 Aug 20;27(38):5184-6.
- [101] World Health Organisation. Influenza vaccine viruses and reagents;
URL:<http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/en/> [Zugriff 06.02.2013]. 2013. 6-2-2013.

-
- [102] Kilbourne ED. Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bull World Health Organ* 1969;41(3):643-5.
 - [103] Baez M, Palese P, Kilbourne ED. Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *J Infect Dis* 1980 Mar;141(3):362-5.
 - [104] Kilbourne ED, MURPHY JS. Genetic studies of influenza viruses. I. Viral morphology and growth capacity as exchangeable genetic traits. Rapid in ovo adaptation of early passage Asian strain isolates by combination with PR8. *J Exp Med* 1960 Mar 1;111:387-406.
 - [105] Halperin SA, Smith B, Mabrouk T, et al. Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children. *Vaccine* 2002 Jan 15;20(7-8):1240-7.
 - [106] Lambert LC, Fauci AS. Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med* 2010 Nov 18;363(21):2036-44.
 - [107] Frey S, Vesikari T, Szymczakiewicz-Multanowska A, et al. Clinical efficacy of cell culture-derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults. *Clin Infect Dis* 2010 Nov 1;51(9):997-1004.
 - [108] Pandey A, Singh N, Sambhara S, Mittal SK. Egg-independent vaccine strategies for highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Hum Vaccin* 2010 Feb;6(2):178-88.
 - [109] Pfleiderer M. [Flu vaccines]. *Pharm Unserer Zeit* 2011 Mar;40(2):126-34.
 - [110] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009 Jun 18;459(7249):931-9.
 - [111] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998 Jan 16;279(5349):393-6.
 - [112] Subbarao K, Shaw MW. Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans. *Rev Med Virol* 2000 Sep;10(5):337-48.
 - [113] Shortridge KF. Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation. *Vaccine* 1999 Jul 30;17 Suppl 1:S26-S29.
 - [114] Wang H, Feng Z, Shu Y, et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet* 2008 Apr 26;371(9622):1427-34.
 - [115] Cheung CL, Vijaykrishna D, Smith GJ, et al. Establishment of influenza A virus (H6N1) in minor poultry species in southern China. *J Virol* 2007 Oct;81(19):10402-12.
 - [116] Xu KM, Li KS, Smith GJ, et al. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in southern China, 2000 to 2005. *J Virol* 2007 Mar;81(6):2635-45.
 - [117] Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999 Sep 11;354(9182):916-7.
 - [118] Luke CJ, Lakdawala SS, Subbarao K. Influenza vaccine - live. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 6th ed. Elsevier Saunders, 2013: p. 294-311.
 - [119] Hai R, Martinez-Sobrido L, Fraser KA, Ayllon J, Garcia-Sastre A, Palese P. Influenza B virus NS1-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach. *J Virol* 2008 Nov;82(21):10580-90.
 - [120] Murphy BR, Coelingh K. Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines. *Viral Immunol* 2002;15(2):295-323.
 - [121] Steel J, Lowen AC, Pena L, et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol* 2009 Feb;83(4):1742-53.
 - [122] Suguitan AL, Jr., McAuliffe J, Mills KL, et al. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med* 2006 Sep;3(9):e360.

-
- [123] Jin H, Lu B, Zhou H, et al. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology* 2003 Feb 1;306(1):18-24.
- [124] Wright PF, Cherry JD, Foy HM, et al. Antigenicity and reactogenicity of influenza A/USSR/77 virus vaccine in children--a multicentered evaluation of dosage and safety. *Rev Infect Dis* 1983 Jul;5(4):758-64.
- [125] Wright PF, Thompson J, Vaughn WK, Folland DS, Sell SH, Karzon DT. Trials of influenza A/New Jersey/76 virus vaccine in normal children: an overview of age-related antigenicity and reactogenicity. *J Infect Dis* 1977 Dec;136 Suppl:S731-S741.
- [126] Calcagnile S, Zuccotti GV. The virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 2010 Feb;10(2):191-200.
- [127] Mischler R, Metcalfe IC. Inflflexal V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine* 2002 Dec 20;20 Suppl 5:B17-B23.
- [128] O'Hagan DT, Tsai T, Reed S. Emulsion-based adjuvants for improved influenza vaccines. In: Rappuoli R, Del Giudice G, editors. *Influenza vaccines for the future*. 2nd ed. Basel, Springer, 2011: p. 327-57.
- [129] Duggan ST, Plosker GL. Intanza 15 microg intradermal seasonal influenza vaccine: in older adults (aged >or=60 years). *Drugs Aging* 2010 Jul 1;27(7):597-605.
- [130] Prophylactic vaccinations;
URL: http://www.en.influenza.pl/ida/prophylactic_vaccinations.html
[Zugriff 08.02.2013]. 2013. 8-2-2013.
- [131] Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol* 2005;18(2):365-72.
- [132] Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 2005 Dec 30;23(50):5751-9.
- [133] Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, et al. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine* 2012 Aug 24;30(39):5761-9.
- [134] Kreijtz JH, Suezer Y, de MG, et al. Preclinical evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vaccine against influenza A/H5N1 viruses. *Vaccine* 2009 Oct 23;27(45):6296-9.
- [135] DiNapoli JM, Nayak B, Yang L, et al. Newcastle disease virus-vectored vaccines expressing the hemagglutinin or neuraminidase protein of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus protect against virus challenge in monkeys. *J Virol* 2010 Feb;84(3):1489-503.
- [136] Vemula SV, Mittal SK. Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2010 Oct;10(10):1469-87.
- [137] Lalor PA, Webby RJ, Morrow J, et al. Plasmid DNA-based vaccines protect mice and ferrets against lethal challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza virus. *J Infect Dis* 2008 Jun 15;197(12):1643-52.
- [138] Fiers W, De FM, El BK, et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 2009 Oct 23;27(45):6280-3.
- [139] Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999 Oct;5(10):1157-63.
- [140] De FM, Fiers W, Martens W, et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine* 2006 Nov 10;24(44-46):6597-601.
- [141] Fiers W, De FM, Birkett A, Neirynck S, Min JW. A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res* 2004 Jul;103(1-2):173-6.
- [142] Lingwood D, McTamney PM, Yassine HM, et al. Structural and genetic basis for development of broadly neutralizing influenza antibodies. *Nature* 2012 Sep 27;489(7417):566-70.

-
- [143] Ben-Yedidia T. Multimeric-001: BiondVax's universal flu vaccine. Interview by Duc Le. Expert Rev Vaccines 2010 Mar;9(3):241-2.
- [144] Yedidia TB. The 3rd international conference on Influenza Vaccines for the World (IVW 2009). Hum Vaccin 2009 Aug;5(8):508-9.
- [145] Oxford J, Gilbert A, Lambkin-Williams R. Influenza vaccines have a short but illustrious history of dedicated science enabling the rapid global production of A/swine (H1N1) vaccine in the current pandemic. In: Rappuoli R, Del Giudice G, editors. Influenza vaccines for the future. 2nd ed. Basel, Springer, 2011: p. 115-47.
- [146] Subbarao K, Chen H, Swayne D, et al. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. Virology 2003 Jan 5;305(1):192-200.
- [147] Krauss U, Eggert T. Ligation Calculator; URL: <http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/> [Zugriff 16.04.2013]. 2013. 16-4-2013.
- [148] World Health Organisation Global influenza programme. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance; URL: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf> [Zugriff 31.01.2012]. WHO/CDS/CSR/NCs/2002.5 Rev.1 . 2002. 31-1-2012.
- [149] Schild GC, Henry-Aymard M, Pereira HG. A quantitative, single-radial-diffusion test for immunological studies with influenza virus. J Gen Virol 1972 Aug;16(2):231-6.
- [150] World Health Organisation. A Description of the Process of Seasonal and H5N1 Influenza Vaccine Virus Selection and Development; URL: <http://www.who.int/influenza/resources/documents/Fluvaccvirusselection.pdf> [Zugriff 07.12.2012]. 2012. 7-12-2012.
- [151] Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R, Klenk HD. Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: The structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. Virology 1981 Dec;115(2):361-74.
- [152] Wagner R, Herwig A, Azzouz N, Klenk HD. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. J Virol 2005 May;79(10):6449-58.
- [153] The European Directorate for the Quality of Medicines. European Pharmacopoeia. 7 ed. 2012.
- [154] Bourmakina SV, Garcia-Sastre A. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. J Gen Virol 2003 Mar;84(Pt 3):517-27.
- [155] Elleman CJ, Barclay WS. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. Virology 2004 Mar 30;321(1):144-53.
- [156] World Health Organisation. Global action plan for influenza vaccines (GAP); URL: http://www.who.int/influenza_vaccines_plan/en/ [Zugriff 21.02.2013]. 2013. 21-2-2013.
- [157] World Health Organisation. Global pandemic influenza action plan to increase vaccine supply; URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.13_eng.pdf [Zugriff: 11.03.2013]. WHO/IVB/06.13;WHO/CDS/EPR/GIP/2006.1 . 2013. 11-3-2013.
- [158] Kieny MP, Costa A, Hombach J, et al. A global pandemic influenza vaccine action plan. Vaccine 2006 Sep 29;24(40-41):6367-70.
- [159] World Health Organisation. Global action plan for influenza vaccines: Objective 2 Increase in vaccine production capacity; URL: http://www.who.int/influenza_vaccines_plan/objectives/objective2/en/index.html [Zugriff 21.02.2013]. 2013. 21-2-2013.
- [160] Partridge J, Kieny MP. Global production of seasonal and pandemic (H1N1) influenza vaccines in 2009-2010 and comparison with previous estimates and global action plan targets. Vaccine 2010 Jul 5;28(30):4709-12.
- [161] Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwolleghem T, et al. Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. Lancet 2007 Aug 18;370(9587):580-9.

-
- [162] Production of pilot lots of inactivated influenza vaccine in response to a pandemic threat: an interim biosafety risk assessment. *Wkly Epidemiol Rec* 2003 Nov 21;78(47):405-8.
- [163] Wood JM, Robertson JS. From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* 2004 Oct;2(10):842-7.
- [164] Wood JM, Major D, Newman RW, et al. Preparation of vaccines against H5N1 influenza. *Vaccine* 2002 May 15;20 Suppl 2:S84-S87.
- [165] Stephenson I, Gust I, Pervikov Y, Kieny MP. Development of vaccines against influenza H5. *Lancet Infect Dis* 2006 Aug;6(8):458-60.
- [166] Horimoto T, Takada A, Fujii K, et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine* 2006 Apr 24;24(17):3669-76.
- [167] Barman S, Ali A, Hui EK, Adhikary L, Nayak DP. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res* 2001 Sep;77(1):61-9.
- [168] Lubeck MD, Palese P, Schulman JL. Nonrandom association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology* 1979 May;95(1):269-74.
- [169] Scholtissek C, Rott R, Orlich M, Harms E, Rohde W. Correlation of pathogenicity and gene constellation of an influenza A virus (fowl plague). I. Exchange of a single gene. *Virology* 1977 Aug;81(1):74-80.
- [170] Rott R, Orlich M, Scholtissek C. Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains. *J Gen Virol* 1979 Aug;44(2):471-7.
- [171] Webster RG, Kawaoka Y, Bean WJ. What is the potential of avirulent influenza viruses to complement a cleavable hemagglutinin and generate virulent strains? *Virology* 1989 Aug;171(2):484-92.
- [172] Ito T, Kawaoka Y, Ohira M, et al. Replacement of internal protein genes, with the exception of the matrix, in equine 1 viruses by equine 2 influenza virus genes during evolution in nature. *J Vet Med Sci* 1999 Aug;61(8):987-9.
- [173] Tian SF, Buckler-White AJ, London WT, Reck LJ, Chanock RM, Murphy BR. Nucleoprotein and membrane protein genes are associated with restriction of replication of influenza A/Mallard/NY/78 virus and its reassortants in squirrel monkey respiratory tract. *J Virol* 1985 Mar;53(3):771-5.
- [174] Murphy BR, Buckler-White AJ, London WT, Snyder MH. Characterization of the M protein and nucleoprotein genes of an avian influenza A virus which are involved in host range restriction in monkeys. *Vaccine* 1989 Dec;7(6):557-61.
- [175] Bergeron C, Valette M, Lina B, Ottmann M. Genetic content of Influenza H3N2 vaccine seeds. *PLoS Curr* 2010;2:RRN1165.
- [176] Fulvini AA, Ramanunnair M, Le J, et al. Gene constellation of influenza A virus reassortants with high growth phenotype prepared as seed candidates for vaccine production. *PLoS One* 2011;6(6):e20823.
- [177] Johansson BE, Bucher DJ, Pokorny BA, Mikhail A, Kilbourne ED. Identification of PR8 M1 protein in influenza virus high-yield reassortants by M1-specific monoclonal antibodies. *Virology* 1989 Aug;171(2):634-6.
- [178] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, McCall S, Taubenberger JK. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus matrix gene segment. *J Virol* 2002 Nov;76(21):10717-23.
- [179] Abt M, de JJ, Laue M, Wolff T. Improvement of H5N1 influenza vaccine viruses: influence of internal gene segments of avian and human origin on production and hemagglutinin content. *Vaccine* 2011 Jul 18;29(32):5153-62.
- [180] Subbarao EK, Perkins M, Treanor JJ, Murphy BR. The attenuation phenotype conferred by the M gene of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted virus (H2N2) on the A/Korea/82 (H3N2) reassortant virus results from a gene constellation effect. *Virus Res* 1992 Sep 1;25(1-2):37-50.

-
- [181] McCauley JW, Mahy BW, Inglis SC. Nucleotide sequence of fowl plague virus RNA segment 7. *J Gen Virol* 1982 Jan;58 Pt 1:211-5.
- [182] Roberts PC, Lamb RA, Compans RW. The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology* 1998 Jan 5;240(1):127-37.
- [183] Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology* 2011 Mar 15;411(2):229-36.
- [184] Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* 2007 Jul;81(13):7111-23.
- [185] Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* 2000 Sep;74(18):8709-19.
- [186] Enami M, Enami K. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* 1996 Oct;70(10):6653-7.
- [187] Simpson DA, Lamb RA. Alterations to influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail modulate virus infectivity. *J Virol* 1992 Feb;66(2):790-803.
- [188] Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* 1991 Jun;182(2):475-85.
- [189] Garcia-Sastre A, Palese P. The cytoplasmic tail of the neuraminidase protein of influenza A virus does not play an important role in the packaging of this protein into viral envelopes. *Virus Res* 1995 Jun;37(1):37-47.
- [190] McCown MF, Pekosz A. Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* 2006 Aug;80(16):8178-89.
- [191] Isken B, Genzel Y, Reichl U. Productivity, apoptosis, and infection dynamics of influenza A/PR/8 strains and A/PR/8-based reassortants. *Vaccine* 2012 Jul 27;30(35):5253-61.
- [192] Schulze-Horsel J, Schulze M, Agalaridis G, Genzel Y, Reichl U. Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production-Flow cytometry and mathematical modeling. *Vaccine* 2009 May 5;27(20):2712-22.
- [193] Plant EP, Liu TM, Xie H, Ye Z. Mutations to A/Puerto Rico/8/34 PB1 gene improves seasonal reassortant influenza A virus growth kinetics. *Vaccine* 2012 Dec 17;31(1):207-12.
- [194] Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res* 2011 Dec;162(1-2):19-30.
- [195] Epstein SL, Price GE. Cross-protective immunity to influenza A viruses. *Expert Rev Vaccines* 2010 Nov;9(11):1325-41.
- [196] Keitel WA, Atmar RL, Cate TR, et al. Safety of high doses of influenza vaccine and effect on antibody responses in elderly persons. *Arch Intern Med* 2006 May 22;166(10):1121-7.
- [197] Licensure of a high-dose inactivated influenza vaccine for persons aged ≥65 years (Fluzone High-Dose) and guidance for use - United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010 Apr 30;59(16):485-6.
- [198] World Health Organisation. Human infection with influenza A(H7N9) virus in China - update 12.04.2013; URL:http://www.who.int/csr/don/2013_04_12/en/index.html [Zugriff 14.04.2013]. 2013. 14-4-2013.
- [199] World Health Organisation. Human infection with influenza A(H7N9) virus in China; URL:http://www.who.int/csr/don/2013_04_01/en/index.html [Zugriff 14.04.2013]. 2013. 14-4-2013.

- [200] Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill* 2013;18(15).
- [201] Belser JA, Bridges CB, Katz JM, Tumpey TM. Past, present, and possible future human infection with influenza virus A subtype H7. *Emerg Infect Dis* 2009 Jun;15(6):859-65.
- [202] Wanitchang A, Kramyu J, Jongkaewwattana A. Enhancement of reverse genetics-derived swine-origin H1N1 influenza virus seed vaccine growth by inclusion of indigenous polymerase PB1 protein. *Virus Res* 2010 Jan;147(1):145-8.

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide

Klonierungsprimer ¹			
Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5' - 3')	Nr ²
Uni-12	RT aller Gensegmente	AGCAAAAGCAGG	48
BsmBI_UniHA_for	Klonierung HA	ATATCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGGA	53
BsmBI_UniHA_rev		ATATCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGGTG	54
BsmBI_UniNA_for	Klonierung NA	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	55
BsmBI_UniNA_rev		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGT	56
BsmBI_UniM_for	Klonierung M	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	73
BsmBI_UniM_rev		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	74

¹übernommen oder modifiziert nach [28]

²interne Oligonukleotid-Zuordnungsnummer

Sequenzierungsprimer ³			
Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5' - 3')	Nr ²
pcDNA3_for	bindet an pHW2000 Amplifikation Insert (for)	GGCTAACTAGAGAACCCACTG	3
Seq_pHH21_for	bindet an pHH21 Amplifikation Insert (for), bindet an pHW2000 Amplifikation Insert (rev)	CGTGTGTGGCTGCGATGGTG	6
Seq_pHH21_rev	bindet an pHH21 Amplifikation Insert (rev)	CACTTTCGGACATCTGGTCG	7
SeqHA_558_for	HA H9N2	CGTGTGGGGCATACATCACC	57
SeqHA_1102_for	HA H9N2	CAAGGGGTTGGTATGGCTGC	58
SeqHA_698_rev	HA H9N2	CCATTGACAAGAGGCCTTGG	59
HA_Rescue_1325_r	HA H9N2	GCCCATATGTCTTGAATTTGGT	64
SeqHA_570_for	HA H9N2	GGCATACATCACCCACCCACCTATAC	129
RTPCR_Sp.HAH5N1f	HA H5N1	ATTGTCAAGAAAGGGGACTCAAC	75
RTPCR_Sp.HAH5N1re	HA H5N1	CAGAAGTTCAGCATTATAAGTCCAG	76
RT HA PR8_f	HA H1N1/PR8, H1N1	AGGAATAGCCCCACTACAAT	111
PR8_HA_for	HA H1N1/PR8, H1N1pdm09	ACAACCAAAGGAGTAACGGCAG	24
PR8_HA_rev	HA H1N1/PR8	AGCCTCTACTCAGTGCGAAAGC	25
KP_HA_for	HA FPVmut	AGCTCCAAATCGTGCCAGCTTC	46
KP_HA_rev	HA FPVmut	TGATGCATGAAACCGTACCACC	47
SeqNA_539_for	NA H9N2	GCTCAAGCTGCCATGATGG	60
SeqNA_1137_for	NA H9N2	CGTTGGTGGTTGGACCACG	61
SeqNA_834_rev	NA H9N2	GCATTCTCCACATGCTGAGC	62
PR8_NA_for	NA H1N1/PR8, H1N1	TGTGCAGAGACAATTGGCATGG	34
PR8_NA_rev	NA H1N1/PR8, H1N1	AAATGCTGCTCGCACTAGTCC	35
KP_NA_for	NA FPVmut	TGCAACCCAAGCATTGCTGGAC	40
KP_NA_rev	NA FPVmut	AGGCACCTTGCTGACCATGCAAC	41
RTPCR_NAH5N1_re	NA H5N1	AACTACTTGTCAATGGTGAATGG	80
RT NA PR8/WSN_f	NA H1N1/PR8, H1N1pdm09	GGAATATAATCTCAATATGGATTAG	119
SeqM_443_f	M H9N2	GTGCCACTTGTGAGCAGATTGCTG	83
SeqM_669_rev	M H9N2	AGGGTGAGTCCCAATTGTCCTCAT	84
RTPCR_MH5N1_re	M H5N1	TCAAGTGCAAGATCCCAATG	82

Anhang

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5' - 3')	Nr ²
RTPCR_MH5N1_f	M H5N1	ATGGAGATCCAAATAATATGGATAG	81
RTPCR_MH5N1_re	M H5N1	TCAAGTGCAAGATCCCAATG	82
PR8_M_for	M H1N1/PR8	ATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAG	28
PR8_M_rev	M H1N1/PR8	TGACCATCGTCAGCATCCACAG	29
KP_M_for	M FPVmut	ACAGCATCGGTCTCACAGACAG	42
KP_M_rev	M FPVmut	ATCGTCAACATCCACAGCACTC	43
PR8_NS_for	NS H1N1/PR8	GCTTCGCCGAGATCAGAAATCC	30
PR8_NS_rev	NS H1N1/PR8	CGCCAACAATTGCTCCCTCTTC	31
KP_NS_for	NS FPVmut	ACTTCGCCGAGATCAGAAAGTCC	44
KP_NS_rev	NS FPVmut	GTCCTGGAAGAGAAGGCAATGG	45
PR8_NP_for	NP H1N1/PR8	AAGGCACCAAACGGTCTTACG	26
PR8_NP_rev	NP H1N1/PR8	TGAACCTTGCATCAGAGAGCAC	27
KP_NP_for	NP FPVmut	CGAACAATGGAGAGGACGCAAC	38
KP_NP_rev	NP FPVmut	TATACACAAGCAGGCAGGCAGG	39
PR8_PA_for	PA H1N1/PR8	CGAGGGAAGAGATCGCACAAATG	32
PR8_PA_rev	PA H1N1/PR8	ACAGCTTGCCCTCAATGTAGCC	33
KP_PA_for	PA FPVmut	GCAGGACCAAAGAAGGAAGACG	36
KP_PA_rev	PA FPVmut	TGACAGAGGACTCAGCCTCAAC	37

²interne Oligonukleotid-Zuordnungsnummer

³z.T. auch Klonierungs- und Genotypisierungsprimer für Sequenzierungen eingesetzt

Genotypisierungsprimer			
Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5' - 3')	Nr ²
RT-PCR HA H3N2 f	364bp Produkt	TTAACCATGAAGACTATCATTGCTTTGAG	136
RT-PCR HA H3N2 r		GTAACAGTTGCTGTAGGCTTTGCT	137
RTPCR HA H9N2 f	305bp Produkt	GCCAAAGAATTACTCCACACAGAG	138
RTPCR HA H9N2 r		CTTGTTCCACTATAGGACACATTCC	139
RT-PCR HA H5N1 f	416bp Produkt	GAAATAGCCCTCAACGAGAGACG	140
RT-PCR HA H5N1 r		TGCATTATCCCTAAGCTGTAGTCG	141
RT-PCR HA H1N1 f	300bp Produkt	CGCCTAACATAGGTGACCAAG	142
RT-PCR HA H1N1 r		GTGTTTGGCACTTCGCATCACAT	143
RTPCR HA H1N1pdm09 f	279bp Produkt	GAATTTTACCACAAATGCGATAACACG	144
RTPCR HA H1N1pdm09 r		TCTCATGCTTCTGAAATCCTAATGTAAATA	145
RT-PCR HA PR8 f	394bp Produkt	CGTCTAACAGTAAGGATCAACAGAATA	146
RT-PCR HA PR8 r		CTCAATTTGGCACTCCTGACGTAT	147
RT-PCR HA FPVmut f	378bp Produkt	GGAGTGGCTCCTGTCAAATACA	148
RT-PCR HA FPVmut r		GGCATCAACCTGCACATCGC	149
RT-PCR NA H3N2 f	338bp Produkt	GAAACATAACAGAGATAGTGTATCTGAC	150
RT-PCR NA H3N2 r		CTTGGTCCCCAGATGAAATGGA	151
RTPCR NA H9N2 f	316bp Produkt	GCCATCTTAACAACGACTATGACAC	152
RTPCR NA H9N2 r		CAAGTGCAAATTGATAACATTTACCAAGAC	153
RT-PCR NA H5N1 f	402bp Produkt	ACACAAAGCTGAACCAATCAGCAATACT	154
RT-PCR NA H5N1 r		CCAGAAATTCCAATTGTCAACCAACTG	155
RT-PCR NA H1N1 f	495bp Produkt	TGCTGAAAAGGACAAAACCTTCAGTGAC	156
RT-PCR NA H1N1 r		GTGAAACATGACCCGTTTCATACAGA	157
RTPCR NA H1N1pdm09 f	366bp Produkt	CAACACCAACTTTGCTGCTGGAC	158
RTPCR NA H1N1pdm09 r		GTTAGCCAATTGATGCCATCATGACAA	159
RT-PCR NA PR8 f	345bp Produkt	GATCGAAAAGGGGAAGGTTACTAAAT	160
RT-PCR NA PR8 r		TCAAACCCATGTCTGGAAGTGTG	161
RT-PCR NA FPV f	310bp Produkt	CCCAAGCATTGCTGGACAGGAT	162
RT-PCR NA FPV r		CTCGAACCTTGAATTGTAGGGAGAA	163
RT-PCR NP FPV f	337bp Produkt	GCTCAGCGACTACGAAGGAAGGC	166
RT-PCR NP FPV r		GTCCATCCCAGTACGCACAAGGGCT	167
RT-PCR NP PR8 f	466bp Produkt	CTTAAACTCAGTGATTATGAGGGACGGT	168
RT-PCR NP PR8 r		GATCCCACGTTTGATCATCCTGACCAA	169

²interne Oligonukleotid-Zuordnungsnummer

8.2 Plasmide

Vektor	Insert	Subtyp	Isolat	analytischer Restriktionsverdau (Fragmentgrößen [bp])	Referenz
pHW2000	HA	H1N1	A/Solomon Islands/3/2006	PvuII (1027+3709)	d. A.
pHW2000	NA	H1N1	A/Solomon Islands/3/2006	PvuII (947+3476)	d. A.
pHW2000	M	H1N1	A/Solomon Islands/3/2006	PvuII (910+3078)	d. A.
pHW2000	HA	H1N1	A/California/07/2009	MunI (586+4152)	d. A.
pHW2000	NA	H1N1 pdm09	A/California/07/2009	PvuII+BamHI (819+3600)	d. A.
pHW2000	M	H1N1 pdm09	A/Hamburg/05/2009	PvuII+PstI (1284+2704)	d. A.
pHW2000	HA	H3N2	A/Wisconsin/67/2005	PvuII+XhoI (966+3757)	d. A.
pHW2000	NA	H3N2	A/Wisconsin/67/2005	PvuII+BamHI (939+3488)	d. A.
pHW2000	M	H3N2	A/Wisconsin/67/2005	PvuII+PstI (1284+2704)	d. A.
pHW2000	HA	H5N1	A/Vietnam/1194/2004 (attenuiert)	PvuII+PstI (1111+3617)	d. A.
pHW2000	NA	H5N1	A/Vietnam/1194/2004	PvuII+BamHI (820+3540)	d. A.
pHW2000	M	H5N1	A/Vietnam/1194/2004	PvuII+PstI (1284+2704)	d. A.
pHW2000	HA	H9N2	A/Huhn/Beijing/2/1997	PvuII (1908+2795)	d. A.
pHW2000	NA	H9N2	A/Huhn/Beijing/2/1997	BamHI+PvuII (940+3479)	d. A.
pHW2000	M	H9N2	A/Huhn/Beijing/2/1997	PstI+PvuI (1265+2723)	d. A.
pPollSapl	PB1	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pPollSapl	PB2	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pPollSapl	PA	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pPollSapl	HA	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pPollSapl	NP	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pPollSapl	M	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pPollSapl	NS	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pPollSapl	NA	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Mount Sinai)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pHH21	PB1	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [152]
pHH21	PB2	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [152]
pHH21	PA	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [152]
pHH21	NP	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [152]
pHH21	NA	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [152]

Anhang

Vektor	Insert	Subtyp	Isolat	analytischer Restriktionsverdau (Fragmentgrößen [bp])	Referenz
pHH21	M	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [152]
pHH21	NS	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [152]
pHH21	HAmut	H7N1	A/Huhn/FPV/Rostock/1934 (attenuiert)	entfällt	Wagner <i>et al.</i> [83]
pcDNA3	PB1	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pcDNA3	PB2	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pcDNA3	PA	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]
pcDNA3	NP	H1N1	A/Puerto Rico/8/1934 (Cambridge)	entfällt	Subbarao <i>et al.</i> [146]

d.A = im Rahmen dieser Arbeit erzeugt

8.3 Influenzasequenzen

Die angegebenen Accession Nummern beziehen sich auf die in der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) veröffentlichten Nukleotidsequenzen (Gen) bzw. Aminosäuresequenzen (Protein), z.T. wird auf Sequenzen verwiesen, die unter einer anderen Isolatbezeichnung in die Datenbank eingestellt wurden, jedoch identisch mit der Sequenz des verwendeten Isolates sind und ggf. eine längere Sequenzinformation bieten:

A/Solomon Island/3/2006 (H1N1)

HA Accession Nr.: Gen = EU100724 Protein = ABU50586
 NA Accession Nr.: Gen = EU124136 Protein = ADN92799
 M Accession Nr.: Gen = CY031341 Protein M1 = ACD37437, M2 = ACD37438

A/California/07/2009 (H1N1pdm09)

Es wurde für die H1N1pdm09-Isolate beschrieben, dass für die Generierung von Doppel-Reassortanten gegebenenfalls spezifische Mutationen im HA notwendig sind, um mit dem Reversen-Genetik-System rekombinante Viren zu erzeugen [202]. Die Herstellung der gewünschten Reassortanten war nur mit einem HA-Protein mit folgender Aminosäure-Signatur (H3-Nummerierung) an Position 212 ein Lysin, an 225 ein Glycin und an 226 ein Glutamin möglich.

HA Accession Nr.: Gen = GQ280121 Protein = ACS45189
 NA Accession Nr.: Gen = CY121682 Protein = AFM72835

A/Hamburg/05/2009 (H1N1pdm09)

M Accession Nr.: Gen = HQ111367 bzw. GQ166219
Protein M1 = ADL41176, M2 = ADL41177 bzw. ACR10231

A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)

HA Accession Nr.: Gen = EU103823 Protein = ABW80978
NA Accession Nr.: Gen = CY034118 Protein = ACF54579
M Accession Nr.: Gen = EU100611 Protein M1 = ABW81691, M2 = AFH00650

Attenuierte Variante des A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)

NA Accession Nr.: Gen = AY651445 Protein = AAT73327
M Accession Nr.: Gen = AY651387 Protein M1 = ABP35631, M2 = AAT70526

HA Accession Nr.: Gen = GQ454861 Protein = ACU65077

Bei dem verwendeten H5N1-Isolat handelt es sich um eine nachweislich attenuierte, niedrigpathogene Variante eines hochpathogenen Wildtyp-Isolates. Die multibasische HA-Spaltstelle (↓) wurde entsprechend der Vorgaben der ZKBS (zentrale Kommission für Biologische Sicherheit) für die Eingruppierung in die Risikogruppe 2 genetisch modifiziert. Neben einer 12 nt langen Deletion wurden zusätzlich einzelne Purine zu Pyrimidinen mutiert, um die potentielle Rekonstitution der zusätzlichen basischen Aminosäuren zu unterbinden (unterstrichen) [146]. Ursache für diese Veränderung ist die Hypothese, die bei der Entstehung der multibasischen Spaltstelle von einer Sequenz-Vervielfältigung aufgrund einer Verzögerung der Replikation durch die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen im angrenzenden Sequenzbereich des purinreichen Abschnittes ausgeht:

Wildtyp-HA-Spaltstelle A/Vietnam/1194/2004 (H5N1):

CCT	CAA	AGA	GAG	AGA	AGA	AGA	AAA	AAG	AGA	↓	GGA	TTA	TTT
Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg		Gly	Leu	Phe

Modifizierte HA-Spaltstelle A/Vietnam/1194/2004 (H5N1):

CCT	CAA	<u>CGA</u>	GAG	entfernt			<u>ACG</u>	<u>CGA</u>	↓	GGA	TTA	TTT
Pro	Gln	Arg	Glu				Thr	Arg		Gly	Leu	Phe

HA-Sequenz H9N2:

137

Anhang

+1	Arg	Asn	Val	Pro	Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu
1021	AGGAATGTGC	CTGCTAGATC	AAGCAGAGGA	CTATTTGGGG	CCATAGCTGG	ATTCATAGAG														
+1	Gly	Gly	Trp	Ser	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Gln	His	Ser	Asn	Asp	Gln	Gly
1081	GGAGGTTGGT	CAGGGCTAGT	CGCTGGTTGG	TATGGGTTCC	AGCATTCAAA	TGATCAAGGG														
+1	Val	Gly	Met	Ala	Ala	Asp	Arg	Asp	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Lys	Ile	Thr	Ser	Lys
1141	GTTGGTATGG	CAGCAGATAG	AGACTCAACT	CAAAAGGCAA	TTGACAAGAT	AACATCCAAG														
+1	Val	Asn	Asn	Ile	Val	Asp	Lys	Met	Asn	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ile	Ile	Asp	His	Glu	Phe	Ser
1201	GTGAATAATA	TAGTCGACAA	AATGAACAAA	CAATATGAAA	TTATTGATCA	TGAATTCAGC														
+1	Gln	Val	Glu	Ala	Arg	Leu	Asn	Met	Ile	Asn	Asn	Lys	Ile	Asp	Asp	Gln	Ile	Gln	Asp	Ile
1261	CAGGTTGAAG	CTAGACTCAA	TATGATCAAT	AATAAGATTG	ATGACCAAAT	TCAAGACATA														
+1	Trp	Ala	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Glu	Asn	Gln	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	His
1321	TGGGCATACA	ACGCAGAATT	GCTAGTGCTG	CTTGAAAACC	AGAAAACACT	CGATGAGCAT														
+1	Asp	Ala	Asn	Val	Asn	Asn	Leu	Tyr	Asn	Lys	Val	Lys	Arg	Ala	Leu	Gly	Ser	Asn	Ala	Met
1381	GATGCGAATG	TAAACAATCT	ATATAACAAA	GTGAAGAGAG	CATTGGGTTT	CAACGCAATG														
+1	Glu	Asp	Gly	Lys	Gly	Cys	Phe	Glu	Leu	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asp	Gln	Cys	Met	Glu	Thr
1441	GAAGATGGGA	AAGGATGTTT	CGAACTATAC	CATAAATGTG	ATGATCAGTG	CATGGAGACA														
+1	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asn	Arg	Arg	Lys	Tyr	Lys	Glu	Glu	Ser	Arg	Leu	Glu	Arg	Gln
1501	ATTCGGAACG	GGACCTATAA	CAGGAGAAAG	TATAAGGAGG	AATCGAGACT	AGAGAGACAG														
+1	Lys	Ile	Glu	Gly	Val	Lys	Leu	Glu	Ser	Glu	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ile	Leu	Thr	Ile	Tyr	Ser
1561	AAAATAGAAG	GGGTAAAGCT	GGAATCAGAA	GGAACCTACA	AAATCCTCAC	CATTTATTCTG														
+1	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Met	Gly	Phe	Ala	Ala	Phe	Leu	Phe	Trp	Ala	Met
1621	ACTGTGCGCT	CATCTCTTGT	GATTGCAATG	GGGTTTGCTG	CCTTCCTTTT	CTGGGCCATG														
+1	Ser	Asn	Gly	Ser	Cys	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile	***								
1681	TCCAATGGAT	CTTGCAGATG	CAACATTTGT	ATATAATTGG	CAAAAACACC	CTTGTTTCTA														
1741	CT																			

NA-Sequenz H9N2:

+2																				
1	AGCAAAAGCA	GGAGTGAAAA	TGAATCCAAA	TCAGAAGATA	ATAGCAATTG	GCTCTGTTTC														
+2	Ser	Leu	Thr	Ile	Ala	Ile	Ile	Cys	Phe	Leu	Met	Gln	Ile	Ala	Ile	Leu	Thr	Thr	Thr	Met
61	TCTAACTATT	GCGATAATAT	GTTTCCTCAT	GCAGATTGCC	ATCTTAACAA	CGACTATGAC														
+2	Thr	Leu	His	Phe	Lys	Gln	Asp	Glu	Cys	Ser	Asn	Pro	Ser	Asn	Asn	Gln	Val	Val	Pro	Cys
121	ACTACATTTT	AAGCAGGATG	AATGCAGCAA	CCCATCGAAT	AATCAAGTAG	TGCCATGTGA														
+2	Glu	Pro	Ile	Ile	Ile	Glu	Arg	Asn	Ile	Val	His	Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Ile	Glu	Lys	Glu
181	ACCAATCATA	ATAGAGAGGA	ACATAGTGCA	TTTGAATAGT	ACTACCATAG	AGAAGGAAAT														
+2	Ile	Cys	Pro	Lys	Val	Ala	Glu	Tyr	Lys	Asn	Trp	Ser	Lys	Pro	Gln	Cys	Gln	Ile	Thr	Gly
241	TTGTCCTAAA	GTAGCAGAAT	ACAAAAATTG	GTCAAAACCA	CAATGTCAAA	TTACAGGGTT														
+2	Phe	Ala	Pro	Phe	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Ile	Arg	Leu	Ser	Ala	Gly	Gly	Asp	Ile	Trp	Val
301	CGCTCCTTTC	TCAAAGGACA	ACTCAATTAG	GCTTTCCGCA	GGTGGGGATA	TCTGGGTGAC														
+2	Thr	Arg	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Cys	Gly	Leu	Gly	Lys	Cys	Tyr	Gln	Phe	Ala	Leu	Gly	Gln
361	AAGAGAACCT	TATGTGTCGT	GCGGTCTTGG	TAAATGTTAT	CAATTTGCAC	TTGGGCAGGG														
+2	Gly	Thr	Thr	Leu	Lys	Asn	Arg	His	Ser	Asn	Gly	Thr	Thr	His	Asp	Arg	Ile	Pro	His	Arg
421	AACCACTTTA	AAAAACAGAC	ACTCAAATGG	CACTACACAT	GATAGAATTC	CTCATAGAAC														

Anhang

	+2	·Thr	Leu	Leu	Met	Asn	Glu	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	His	Leu	Gly	Thr	Lys	Gln	Val	Cys	Ile	Ala	·
481		CCTTTTAATG	AATGAGTTAG	GTGTCCCGTT	TCATTTGGGA	ACCAAACAAG	TGTGCATAGC																
	+2	·Ala	Trp	Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	His	Asp	Gly	Lys	Ala	Trp	Leu	His	Ile	Cys	Val	Thr	Gly	Asp	·
541		ATGGTCCAGC	TCAAGCTGCC	ATGATGGGAA	AGCATGGTTA	CATATTTGTG	TCACTGGGGA																
	+2	·Asp	Asp	Lys	Asn	Ala	Thr	Ala	Ser	Ile	Ile	Tyr	Asp	Gly	Met	Leu	Val	Asp	Ser	Ile	Gly	Ser	·
601		TGATAAAAAT	GCGACTGCTA	GTATCATTTA	TGATGGGATG	CTTGTTGACA	GTATTGGTTC																
	+2	·Ser	Trp	Ser	Lys	Asn	Ile	Leu	Arg	Thr	Gln	Glu	Ser	Glu	Cys	Val	Cys	Ile	Asn	Gly	Thr	Cys	·
661		ATGGTCCAAA	AACATCCTCA	GAAGTCAGGA	ATCAGAATGC	GTTCGCATCA	ATGGAAGTTG																
	+2	·Cys	Thr	Val	Val	Met	Thr	Asp	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Lys	Ala	Asp	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ile	·
721		TACGGTAGTA	ATGACTGATG	GAAGTGCATC	AGGAAAGGCT	GACACTAGAA	TACTATTCAT																
	+2	·Ile	Arg	Glu	Gly	Lys	Ile	Val	His	Ile	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Ala	Gln	His	Val	Glu	Glu	·
781		AAGAGAGGGG	AAAAATTGTG	ATATTAGCCC	ATTGTCAGGA	AGTGCTCAGC	ATGTGGAGGA																
	+2	·Glu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Arg	Tyr	Pro	Glu	Val	Arg	Cys	Val	Cys	Arg	Asp	Asn	Trp	Lys	Gly	·
841		ATGCTCCTGT	TACCCCGGT	ACCCAGAAGT	TAGGTGTGTT	TGCAGAGACA	ATTGGAAGGG																
	+2	·Gly	Ser	Asn	Arg	Pro	Val	Leu	Tyr	Ile	Asn	Met	Ala	Asp	Tyr	Ser	Ile	Glu	Ser	Ser	Tyr	Val	·
901		ATCTAATAGG	CCCGTTCTAT	ATATAAATAT	GGCAGATTAT	AGTATTGAGT	CCAGTTATGT																
	+2	·Val	Cys	Ser	Gly	Leu	Val	Gly	Asp	Thr	Pro	Arg	Asn	Asp	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Cys	·
961		GTGCTCAGGA	CTTGTTGGCG	ATACACCAAG	AAATGATGAT	AGCTCCAGCA	GCAGCAACTG																
	+2	·Cys	Arg	Asp	Pro	Asn	Asn	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Trp	Ala	Phe	Asp	Asp	Glu	·
1021		CAGGGATCCT	AATAACGAGA	GAGGGGCCCC	AGGAGTGAAA	GGGTGGGCCT	TTGACGATGA																
	+2	·Glu	Asn	Asp	Ile	Trp	Met	Gly	Arg	Thr	Ile	Lys	Asp	Asp	Ser	Arg	Ser	Gly	Tyr	Glu	Thr	Phe	·
1081		AAATGATATT	TGGATGGGAC	GAACAATCAA	AGATGATTCA	CGCTCAGGTT	ATGAGACTTT																
	+2	·Phe	Arg	Val	Ile	Gly	Gly	Trp	Thr	Thr	Ala	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	·
1141		CAGGGTCATT	GGTGGTTGGA	CCACGGCTAA	TTCCAAGTCA	CAGATAAATA	GACAAGTCAT																
	+2	·Ile	Val	Asp	Ser	Asp	Asn	Trp	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ile	Phe	Ser	Val	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	·
1201		AGTTGACAGT	GACAACTGGT	CTGGGTATTC	TGGTATCTTC	TCTGTTGAAG	GCAAAAAGTG																
	+2	·Cys	Ile	Asn	Arg	Cys	Phe	Tyr	Val	Glu	Leu	Ile	Arg	Gly	Arg	Pro	Gln	Glu	Thr	Arg	Val	Trp	·
1261		CATCAACAGG	TGTTTTTATG	TGGAATTGAT	AAGAGGAAGA	CCACAGGAGA	CTAGGGTGTG																
	+2	·Trp	Trp	Thr	Ser	Asn	Ser	Ile	Ile	Val	Phe	Cys	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gly	Thr	Gly	Ser	·
1321		GTGGACTTCA	AATAGTATCA	TTGTATTTTG	TGGAACCTCG	GGTACCTATG	GAACAGGCTC																
	+2	·Ser	Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Asn	Ile	Asn	Phe	Met	Pro	Ile	***								
1381		ATGGCCTGAT	GGGCGAATA	TCAACTTCAT	GCCTATATAA	GCTTTCGCAA	TTTtagAAAA																
1441		AAACTCCTTG	TTTCTACT																				

M-Sequenz H9N2:

140

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation:

**Untersuchungen zur Optimierung der genetischen Konstellation von
Influenzaimpfstoff-Saatviren unter Verwendung einer attenuierten Mutante des
Virusisolats A/FPV/Rostock/1934 (H7N1)**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Frankfurt am Main, 06.06.2013

.....
Nina Alex

Lebenslauf

– entfällt bei der online Version –

– entfällt bei der online Version –

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, insbesondere folgende Personen möchte ich hervorheben:

Dr. Ralf Wagner für die Ermöglichung, die Betreuung, die Geduld und die langjährige Unterstützung ohne ihn wäre diese Arbeit niemals entstanden sowie Herrn Prof. Dr. Eberhard Hildt für sein stetiges Interesse und die Übernahme meiner Betreuung.

Bedanken möchte ich mich insbesondere auch bei Herrn Prof. Dr. Michael Bölker, der freundlicherweise die Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Marburg übernommen hat sowie den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission bestehend aus Frau Prof. Dr. Susanne Önel und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel.

Im Fachgebiet 2/1 „virale Impfstoffe“ des PEI gilt mein ganz besonderer Dank Britta Neumann für die Unterstützung bei den SRID-Assays und Joanna Hamann, sowie für die Einarbeitung Corinna Erfurth und Dr. Constanze Göpfert, die sich stets Zeit für mich genommen hat. Für die Geduld, die aufbauenden Worte und die Möglichkeit meine Arbeit in Ruhe abschließen zu können möchte ich mich ganz herzlich bei dem Fachgebietsleiter Dr. Michael Pfeiderer und allen weiteren Kolleginnen und Kollegen bedanken. Ich weiß, dass dies nicht selbstverständlich war.

Mein Dank gilt weiterhin dem Fachgebiet 2/0 „Forschung beim Abteilungsleiter“ für die Adoption als zusätzliche Doktorandin in ihrem Kreise, inklusive der fachlichen Unterstützung im Rahmen der Seminare und der menschlichen Unterstützungen im Alltag.

Bedanken möchte ich mich desweiteren bei dem Fachgebiet 3/3 „Morphologie“ des PEI und hier insbesondere Regina Eberle für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie sowie dem Fachgebiet ZT „zentrale Tierhaltung“ für die Bereitstellung des Tierblutes.

Die Arbeit wurde ermöglicht durch die finanzielle Unterstützung durch das BMBF geförderte FluResearchNet-Projekt und die Ermöglichung der Durchführung am Paul-Ehrlich-Institut unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Cichutek.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei Anja de Vries, Dr. Daniela Ploen und Dr. Nadja Kettern.

Zuletzt gilt mein ganz persönlicher Dank meinen Eltern, die mich stets bei allem unterstützen, motivieren, fördern und immer für mich da sind.

Danke Euch allen für die grenzenlose Hilfe!